

**Imidazoltartalmú ligandumok és inozitolszármazékok
kölcsonhatása réz(II)- cink(II)- és nikkel(II)ionokkal:
egyensúly, szerkezet, hidrolitikus aktivitás**

Doktori (PhD) értekezés

Apróné Török Ibolya

Témavezető: Dr. Gajda Tamás

**Szegedi Tudományegyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
Biokoordinációs Kémiai Kutatócsoport
Szeged
2002**



Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések	2
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. A réz- és cinkproteinek általános jellemzése	5
2.2. Modellvegyületek a réz- és cinkproteinek köréből	8
2.3. Imidazolszármazékok komplexképző sajátságai	12
2.4. A foszfoészterázok és modellvegyületeik	14
2.4.1. Modellezés aktivált foszfátészterekkel	18
2.4.2. Modellvizsgálatok nemaktivált foszfátészterekkel	20
3. Kísérleti rész	22
3.1. Felhasznált anyagok	22
3.2. Az alkalmazott vizsgálati módszerek	26
3.2.1. Potenciometriás titrálások	26
3.2.2. Spektroszkópiás vizsgálatok	29
3.2.3. Kinetikai mérések	29
4. Eredmények és értékelésük	34
4.1. Kétfogúként koordinálódó imidazolszármazékok Cu(II)-, Zn(II)- és Ni(II)komplexei	34
4.2. Többfogú, nem lineáris szerkezetű imidazolszármazékok réz(II)- és cink(II)komplexei	41
4.3. Többfogú, lineáris szerkezetű imidazolszármazékok réz(II)- és cink(II)komplexei	53
4.3.1. Kinetikai mérések a cink(II)–mbimdm rendszerben	56
4.3.2. Vegyesligandumú komplexek képződése katecholokkal	57
4.4. A hisztamin alegységet tartalmazó dhen réz(II)- és cink(II)komplexei	68
4.4.1. A cink(II)komplexek hidrolitikus aktivitásának vizsgálata nemaktivált foszfátészterek segítségével	81
4.5. Inozitolszármazékok réz(II)komplexeinek hatása aktivált foszfátészterek hidrolízisére	86
4.5.1. A réz(II)–tdci rendszer	91
4.5.2. A réz(II)–tmci rendszer	98
5. Összefoglalás	104
6. Irodalomjegyzék	108
7. Summary	114
8. A disszertáció anyagához kapcsolódó és egyéb közlemények	118
Köszönetnyilvánítás	

1. Bevezetés és célkitűzések

A bioszervetlen kémiai kutatások egyik fő iránya a metalloproteinek szerkezetének és tulajdonságainak mind jobb leírása [1-7]. A natív enzimek kinetikai sajátságainak valamint szerkezetének tanulmányozása mellett kis molekulatömegű modellvegyületeik vizsgálata is jelentékeny módon hozzájárulhat az enzimek működési mechanizmusának megértéséhez. Az ilyen egyszerű rendszerek könnyebben tanulmányozhatók, sőt a hatékony modellrendszerek segítségével lehetővé válhat az adott enzim mesterséges analógjainak kifejlesztése is. A metalloproteinek szerkezetét és tulajdonságait alapvetően az úgynevezett oldallánci donorcsoportok koordinációja határozza meg. Ebből a szempontból az imidazolgyűrű az egyik legfontosabb donorcsoport, hiszen kivételesen stabil fémkötőhelyet biztosít a fiziológias pH-tartományban, tautomer sajátsága révén igen gyakran szerepel protontranszfer folyamatokban, így amellet, hogy a legtöbb réz(II)- és cink(II)tartalmú enzim aktív centrumában megtalálható, önmagában is betölthet katalitikus funkciót.

Hidrolitikus enzimek tekintetében, ezidáig csak néhány imidazolgyűrűt tartalmazó ligandum fémkomplexével történt kinetikai vizsgálat [8-10] – holott például a cink(II)tartalmú foszfátáz enzimek mindegyike hisztidil-egységeken keresztül köti a fémeket – így kevésbé ismertek a gyűrű natív enzimekben betöltött szerepének részletei. Az élő szervezetben lejátszódó hidrolitikus folyamatok közül a foszfátészter kötés hidrolízisének a legkülönbözőbb alapvető élettani folyamatokban meghatározó szerepe van: a DNS illetve az RNS hidrolízise lehetővé teszi azok biológiai korrekcióját és lebontását, az ATP hidrolízise közvetlen energiát, a glükolízis foszfátészter átmeneti termékeken keresztül ATP-t szolgáltat vagy például a glükóz-6-foszfát hidrolízisével szabályozható a vércukorszint. Ezeket a folyamatokat az úgynevezett foszfoészteráz enzimek [6,7] katalizálják, melyek közül is kiemelkedő a DNS és az RNS korrekciójában illetve lebontásában résztvevő úgynevezett nukleáz enzimek jelentősége. A mesterséges nukleázok vizsgálata iránt az elmúlt tíz esztendőben egyre nagyobb az érdeklődés, hiszen ezek az anyagok rendkívül nagy jelentőségre tehetnek szert a biotechnológiában, a génsebészetben vagy a gyógyászatban, így például a kemoterápia területén is.

Munkánk során elsősorban olyan kis molekulatömegű fémkomplexek vizsgálatát tűztük ki célul, amelyek nem csak szerkezeti, hanem funkcionális szempontból is metalloenzimek aktív centrumának modellvegyületei lehetnek. Ezen célkitűzés megvalósítása érdekében először a fémion–ligandum kölcsönhatás egyensúlyi viszonyait és a képződő

komplexek oldatbeli szerkezetét kell tisztáznunk. Szerkezet–hatás összefüggések keresése érdekében tanulmányoznunk kell az imidazolgyűrű szubsztituenseinek illetve a ligandum egyéb donorcsoportjainak hatását a képződő komplexek stabilitására és szerkezetére. A hidrolitikus aktivitás szempontjából az egyik legfontosabb követelmény, hogy a fémkomplexek két egymáshoz képest *cisz*-helyzetben lévő koordinációs helyet tartsanak, ahová a szubsztrát illetve a nukleofil reaktáns kötődhet. Mivel a fémhez koordinált víznek illetve hidroxidionnak, mint nukleofil reaktánsnak a legtöbb hidrolitikusan hasító enzim működési mechanizmusában meghatározó szerepe van, ezért elsősorban azon fém–ligandum rendszerek esetén várhatunk számottevő kinetikai aktivitást, amelyekben vegyes hidroxokomplex képződik, az alkalmazhatóság tekintetében pedig nem elhanyagolható, hogy ezen komplexképzési folyamat a semleges pH-tartomány környékén játszódjon le.

A legtöbb réz(II)- és cink(II)tartalmú enzim aktív centrumát szerkezetileg is modellező, imidazolgyűrűt tartalmazó ligandumok mellett néhány, az előzetes vizsgálatok alapján igen ígéretes szintetikus inozitolszármazéktól is jelentős foszfoészteráz aktivitás remélhető. Ezeket a származékokat Hegetschweiler és munkatársai szintetizálták a Saarbrückeni egyetemen, nehézkes és veszélyes köztitermékek képződésével járó előállításukat a kutatók a 90-es évek elején kidolgozott eljárásukkal jelentősen egyszerűsítették. Emellett néhány imidazolszármazék katecholokkal történő vegyesligandumú komplexképződésének vizsgálata a tirozináz aktivitás kapcsán szolgálhat új eredményekkel, melynek ugyan nem elegendő, de szükséges feltétele a nagy stabilitású vegyeskomplex kialakulása.

A fentiek alapján célul tűztük ki:

- különböző, igen változatos szerkezettel bíró imidazolgyűrűt tartalmazó ligandumok előállítását és koordinációs sajátosságainak tanulmányozását pH-metriás módszerrel réz(II)-, cink(II)- és nikkel(II)ion tartalmú rendszerekben
- a képződő komplexek koncentrációeloszlása ismeretében a koordinációban résztvevő donorcsoportok és a komplexek oldatbeli szerkezetének meghatározását spektroszkópiás (UV-látható, CD, ESR és NMR) módszerekkel és ezek számítógépes kiértékelésével
- a tirozináz aktivitás kapcsán néhány imidazolszármazék és analógjaik katecholokkal történő vegyesligandumú komplexképződésének tanulmányozását oldategyensúlyi módszerekkel
- a hidrolitikus aktivitás tanulmányozását spektrofotometriásan és HPLC-technikával azon fém–ligandum rendszerekben, amelyekben az egyensúlyi adatok alapján hidroxokomplex

képződik a semleges pH-tartomány környékén

– szintetikus inozitolszármazékok foszfoészteráz aktivitásának és szubsztrátspecifikusságának tanulmányozását spektrofotometriás módszerrel

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A réz- és cinkproteinek általános jellemzése

Az imidazolgyűrű kivételes sajátságainak köszönhetően számos biokémiai folyamatban meghatározó szerepet tölt be. Peptidekben és proteinekben az egyetlen olyan alkotórész, amely képes protonáltsági állapotát a biológiai közeg biztosította pH-tartományban megváltoztatni, emellett erős elektronpádonor sajátsága a hisztidil-egységek oldalláncaként meglehetősen stabil és flexibilis fémkötőhelyet biztosít, tautomériája pedig a protontranszfer rendszerek kulcsfontosságú részévé teszi. Jól ismert, hogy az eddig tanulmányozott rézproteinek mindegyike tartalmaz aktív centrumában egy vagy több imidazolgyűrűt, kivéve a szervezet méregtelenítési funkciójában résztvevő kis molekulatömegű fehérjéket, az úgynevezett metallotionéneket.

A fémion körül kialakuló környezet alapján a rézproteineket három, illetve újabban négy csoportra oszthatjuk [1-5]. Az I-es típusú (vagy kék-réz) proteinek aktív centrumában a rézion két hisztidin imidazol-oldalláncának nitrogénjéhez, továbbá egy cisztein és egy metionin kénatomjához kapcsolódik. A koordináció erősen torzult tetraéderes geometriával írható le, amely jellemző spektrális sajátságokat eredményez. ESR-spektruma szokatlan ($A_{||} = 30-70$ G), a látható spektrumon egy igen intenzív ($\epsilon = 3000-6000$ M⁻¹cm⁻¹) abszorpciós sáv jelenik meg 600 nm körül, amely a S→Cu töltésátviteli sávnak tulajdonítható. A kialakuló erősen torzult koordinációs szféra se a réz(I), se a réz(II) számára nem kedvező, ebből adódóan rendkívül hajlamos redoxiátalakulásokra, ami lehetővé teszi, hogy elektrontranszfer folyamatokban közvetítő szerepet töltsenek be. A csoport egyik jellemző képviselője a zöld növényi levelek kloroplasztjaiban megtalálható kulcsfontosságú elektronátadó fehérje a plasztocianin.

A II-es típusú rézproteinek aktív centruma az előző csoporthoz hasonlóan egyetlen rézcentrumot tartalmaz négyes vagy ötös koordinációban, a donorcsoportok jellemzően a hisztidil-oldalláncok imidazolgyűrűi. Az aktív centrum környezete síknégyzetes vagy négyzetes piramisos, ennek következtében spektrális paraméterei "normálisak", azaz olyanok, mint általában a réz(II)komplexeké ($A_{||} = 150-200$ G, $\epsilon = 20-120$ M⁻¹cm⁻¹). A csoport egyik legfontosabb képviselője a szuperoxid-dizmutáz (SOD), amely egy dimerszerkezetű metalloenzim, alegységenként egy réz(II)-t és egy cink(II)-t tartalmaz, melyeket mindkét nitrogénjén deprotonált imidazoláthíd köt össze. A réz(II) körüli geometria torzult négyzetes piramisos, míg a cink(II) esetén torzult tetraéderes. A katalitikus funkció feltétele a réz(II)

jelenléte az aktív helyen, míg a cink(II) csak szerkezetstabilizáló szerepet játszik és más fémionok is pótolhatják. Ez az enzim katalizálja a szuperoxid bontását, amelynek felhalmozódása jelentős szerepet játszik az öregedési folyamatokban, de az ízületi gyulladás, az epilepsziás roham és a rák kialakulásában is.

A III-as típusú rézproteinek aktív centrumában két rézion található, melyeket három-három imidazolgyűrű vesz körül. Oxidált állapotban a két fémion között erős antiferromágneses kölcsönhatás alakul ki (ESR inaktív). Ebbe a csoportba tartozik a hemocianin és a tirozináz enzim. A hemocianin egyes állati szervezetekben (puhatestűek) az oxigén szállítását végzi, funkciója tehát analóg a hemoglobinnal. A tirozináz pedig fenolszármazékok oxidációját katalizálja kinonokká, ami igen fontos, hiszen közismert ezek erősen mérgező tulajdonsága.

A IV-es típusú rézproteinek közös jellemzője, hogy több, minimálisan négy rézionot tartalmaznak, döntően imidazolnitrogénekkel körülvéve. Tulajdonképpen ez a csoport az előző három kombinációjának tekinthető, hiszen mindhárom típusú rézcentrumot tartalmazzák, így fizikai és kémiai sajátyságaik ennek megfelelően alakulnak. Ebbe a csoportba tartozik az emberi szervezet egyik legfontosabb réztartalmú fehérjéje a cöruoplazmin, amely a májban szintetizálódik. A réz felszívódását aminosavak segítik elő, minthogy igen stabilis komplexet képeznek a rézzel, a felszívódott réz a szérum-albuminhoz kötődve jut el a májba, ahol a cöruoplazmin megkötí, majd a vérkeringésbe juttatja és szállítja a gerincesek vérében keringő réz mintegy 90-95 %-át.

A felszívódott réz szállításáért felelős szérum-albumin viszont egyik előbb említett csoportba sem sorolható. A részletes vizsgálatok kimutatták, hogy a réz(II) az N-terminális Asp-Ala-His fragmenthez kapcsolódik, mégpedig $\{N_{am}, N^-, N^-, N_{im}\}$ nitrogénekhez síknégyszetes geometria szerint. A vér pH-ján ez rendkívül stabilis komplexet eredményez. A többi rézproteintől teljesen eltérő módon ebben az esetben a peptidnitrogének koordinálódnak. Fém távollétében a peptidnitrogén protonja csak igen magas pH-n disszociál ($pK \sim 14,5$), bizonyos fémek jelenlétében már jóval alacsonyabb pH-kon is leszorítható ($pK = 4-6$ a réz(II), $pK = 6-8$ a nikkel(II) esetén). Előfordulhat, hogy a szervezetben genetikai okok miatt csökkent mértékű a cöruoplazmin termelés, ennek következtében a szérum-albuminhoz kötött réz nem a cöruoplazminba kerül át, hanem elsősorban az agy-, máj- és veseszövetek kötik meg, súlyosan károsítva ezzel ezeket a szerveket. Amikor felismerték, hogy a betegséget (Wilson-kór) a cöruoplazmin hiánya okozza, megpróbálták a rézfelesleget különféle komplexképzőkkel megkötöni és eltávolítani. Alkalmaztak EDTA-t, különböző

kédonorokat (dimerkapto-propanol, D-penicillamin), melyek hatása azonban nem specifikus (más ionokat is megkötnek) illetve toxikusak, ezért tartósan nem használhatók. Sarkar és munkatársai a szérum-albumin fémkötőhelyét az ismert aminosavszekvencia alapján modellezve, hasonló szerkezetű tripeptidet (Gly-Gly-His) szintetizáltak, amely ellentétben az előzőekkel nem toxikus és könnyen átjut a sejtmembránon, ezért alkalmas a káros rézlerakódások jelentős részének az eltávolítására [11]. A sejtek rézfelvételének zavara miatt kialakuló betegség (Menkes-kór) sem gyógyítható egyszerűen a rézionok bevitelével, mert a vér megfelelő rézkoncentrációja ellenére a sejtek nem képesek azt felvenni. A legjobb eredményeket ebben az esetben a réz(II)-L-hisztidin rendszerben képződő ML_2 komplex adagolásával érték el.

A cinkproteinek alapvetően három különböző koordinációs szférával fordulnak elő [1-4,6,7]. Az első csoportra jó példa lehet a szénsav-anhidráz nevű enzim, amelyet 1940-ben fedeztek föl elsőként a cinktartalmú enzimek közül. Az enzim a szén-dioxid reverzibilis hidratációját katalizálja, különböző változatai a növény- és állatvilágban egyaránt elterjedtek. Működése igen fontos a légzés, a fiziológiás pufferolás és az iontranszport szempontjából, de hasonlóképpen a csontképződésben is. Aktív centrumában a cink(II)ionhoz három imidazolgyűrű és egy víz koordinálódik torzult tetraéderes elrendeződéssel. A fémion környezete jelentősen befolyásolja a kötött víz pK-ját, magában a fehérjében már fiziológiás pH-n deprotonálódik, s az így kialakult hidroxidion nukleofil támadást hajt végre a szén-dioxid részlegesen pozitív töltésű szénén. A mechanizmusban a víz deprotonálódása révén felszabadult proton szállításáért egy a központi fémionhoz nem koordinálódó hisztidin-oldallánc imidazolgyűrűje a felelős. A protontranszfer folyamat indirekt módon megy végbe, a cinkhez kapcsolódó víz hidrogénkötésekkel vízmolekulák sokaságával létesít kapcsolatot, amelyek közvetítő szerepet töltenek be a cinkhez nem koordinálódó hisztidin-oldallánc és a fémionhoz koordinált víz között. A hidrolízis sebessége az enzim hatására mintegy kilenc nagyságrenddel nő meg. A cinkproteinek második csoportjába tartozik például a karboxipeptidáz, aktív centrumában a cink(II)ionhoz két hisztidin imidazol-oldalláncának nitrogénje, egy glutaminsav karboxilcsoportja és egy vízmolekula koordinálódik torzult oktaéderes geometriával. Működése a polipeptidek karboxiterminális peptidkötésének hidrolízisét segíti elő. A harmadik csoport jellemző képviselői például a cink-ujj proteinek, amelyekben két hisztidin és két cisztein oldallánc tetraéderesen koordinálja a cink(II)-et. A cink-ujj hatására kialakuló DNS-fehérje kölcsönhatás szerepet játszik például a génszabályozásban, a transzkripciós faktorok működésében illetve a replikáció folyamatában.

2.2. Modellvegyületek a réz- és cinkproteinek köréből

A metalloproteinek szerkezetének és fizikai-kémiai sajátságainak egyre bővülő ismeretanyaga alkalmas szerkezeti és funkcionális modellvegyületek kifejlesztését tette lehetővé (1. ábra), mindamellett az esetleges gyakorlati felhasználás szempontjából természetesen nem szükséges a szoros szerkezeti analógia.

Malachowski és munkatársai nitrogén- és kéndonoratomokat tartalmazó ligandumokat [pl. 2,2'-bisz-(4-metilimidazol-ilmetilszulfanil)bifenil, 2,2'-bisz-(2-piridil-etilszulfanil)bifenil; I és II az 1. ábrán] vizsgálták a kék-réz proteinek modellvegyületeiként [12]. Céljuk olyan vegyületek előállítása volt, melyek a fémionok számára az I-es típusú rézproteinekre jellemző geometriát biztosítanak, ezért választották a ligandumok központi részeként a bifenilt, amelyben az aromás gyűrűk köztudottan nem planárisan helyezkednek el. Emellett alkalmasan megválasztott szubsztituensek sztérikus hatása befolyásolhatja az alapmolekulában az aromás gyűrűk síkja által bezárt 42 fokos szöveget, ezáltal a torzulás mértékét is. Megállapították, hogy a ligandumok a réz(II)-t redukálják, a képződő réz(I)komplexek szerkezetét pedig röntgenkristallográfiásan határozták meg, melyekben a fémion körül torzult tetraéderes geometria alakul ki. Analóg, különböző donorcsoportokat tartalmazó ligandumokkal összehasonlítva csak a vizsgált két nitrogén- és két kéndonoratomot tartalmazó modellvegyületek redoxipotenciálja éri el a kék-réz proteinekre jellemző nagy értékeket.

Jun-ichi és munkatársai oligopeptidek réz(II)komplexeinek reakcióit vizsgálták aktív oxigént tartalmazó részecskékkel és megállapították, hogy a hisztidintartalmú peptidek mindegyike hatékonyan katalizálja a szuperoxid (O_2^-) dizmutációját, közülük pedig az N-terminális pozícióban hisztidint tartalmazó peptidek, melyek imidazolhidas kétmagvú komplexeket alakítanak ki, a H_2O_2 -ot hatékonyabban aktiválják [13]. A Cu-Zn SOD aktív centrumának modellezésére Tabbi és munkatársai olyan ötfogú ligandumot szintetizáltak [1,5-bisz(1-pirazolil)-3-(bisz(2-imidazolil)metil)azapentán; III az 1. ábrán], amelynek kétmagvú rézkomplexében a fémionok körül a natív enzimnek megfelelő geometria alakul ki és az egyik imidazolgyűrű hídként kapcsolja össze a különböző koordinációs szférával rendelkező rézcentrumokat [14]. Fiziológias pH-n az előállított komplex stabil és igen jelentős SOD aktivitással rendelkezik. Pierre és munkatársai egy olyan makrobiciklusos kriptandot (1. ábra, IV) szintetizáltak, amelynek kétmagvú réz(II)komplexét illetve réz(II)-t és cink(II)-t tartalmazó vegyeskomplexét is előállították [15]. A hídként funkcionáló imidazolgyűrűt a $[Cu(im)Cu](ClO_4)_3$ illetve a $[Cu(im)Zn](ClO_4)_3$ komplexek illetve a nyolc

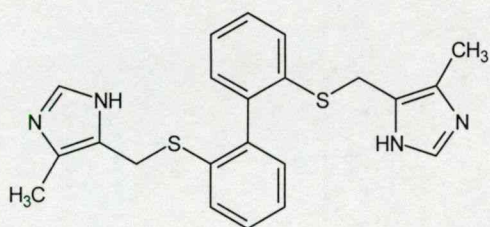
nitrogéndonoratomot tartalmazó kriptand reakciójával építették be a modellvegyületbe, míg az előző esetben maga a kiindulási ligandum hordozta a hídmolekulát. Röntgenszerkezet vizsgálatok alapján megállapították, hogy az egyik fémion körül torzult trigonális bipiramisos, míg a másik körül torzult négyzetes piramisos szerkezet alakul ki. A kétmagvú réz(II)komplex pH = 4,5-12, míg a vegyeskomplex pH = 6-10,5 között stabil, aktivitásukat pedig – hasonlóan az előző modellvegyülethez – nem vesztik el a szérum-albumin jelenlétében sem, amely a modellvegyületek többségéből kivonja a réz(II)-t. A vizsgálatok alapján mindhárom komplex jól modellezi a szuperoxid-dizmutázt mind szerkezeti, mind funkcionális szempontból.

Sorrel 1989-ben összefoglaló munkájában [16] a kétmagvú rézproteinek, a hemocianin és a tirozináz szintetikus modellvegyületeit tárgyalja részletesen. Igen változatos szerkezettel bíró rézkomplexek spektrális és fizikai-kémiai sajátságait hasonlítja össze és megállapítja, hogy az imidazolszármazékok igen ígéretesek és vizsgálatuk hatékony modellvegyületek kifejlesztéséhez vezethet. Reedijk és munkatársai bisz(imidazol-2-il)metil-amin egységet tartalmazó ligandumok réz(II)komplexeit állították elő egykristály formájában a kétmagvú rézproteinek modellvegyületeiként [17]. A ligandumok közül a négyfogú, három imidazolgyűrűvel rendelkező [bisz(1,1'-imidazol-2-il)(4-imidazol-4(5)-il)-2-azabután, biib; V az 1. ábrán] és a réz(II) etanolos oldatából imidazolhidas Cu_2L_2 összetételű, négyzetes piramisos szerkezetű komplex kristályosodik ki, amelyben a fémionokat négy nitrogén veszi körül az ekvatoriális síkban, továbbá axiálisan egy-egy anion (ClO_4^- , NO_3^- és BF_4^-) koordinálódik [18,19]. Wei és munkatársai négyfogú tripodális ("háromlábú") ligandumok [(bisz(2-piridil)metil)((1-metilimidazol-2-il)metil)amin) bpia, (bisz(1-metilimidazol-2-il)metil)((2-piridil)metil)amin) bipa; VI és VII az 1. ábrán] réz(I)komplexeinek oxigénfelvevő sajátságait tanulmányozták [20]. Az analóg [tris((2-piridil)metil)amin] ligandummal összehasonlítva a bpia származék hasonló spektrális és oxigénfelvevő sajátságokkal rendelkezik, ebben az esetben az oxigénfelvétel során transz-(μ -1,2-peroxo)komplex képződik [21]. Ezzel ellentétben az 1-metil-imidazolcsoporttal kétszeresen szubsztituált bipa teljesen eltérő módon viselkedik, az oxigénfelvétel során képződő kevésbé stabil termék paraméterei (μ - η^2 : η^2 -peroxo)komplex képződésére utalnak. A tapasztalt meglepő viselkedés tanulmányozására a szerzők további imidazoltartalmú ligandumok vizsgálatát javasolják.

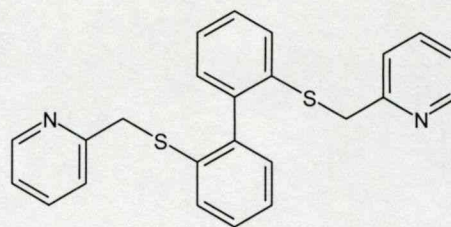
Krebs és munkatársai a III-as típusú rézproteinek csoportjába tartozó katechol-oxidázt modellezték ötfogú, köztük imidazolnitrogén donoratomokkal is rendelkező ligandumok [pl. 4-bromo-2,6-bisz{[2-(1-metil-2-imidazolil)-etil]aminometil} fenol, 4-bromo-2-(4-metil-

piperazin-1-ilmetil)-6-{-[2-(1-metil-2-imidazolil)etil]aminometil}fenol; VIII és IX az 1. ábrán] kétmagvú réz(II)komplexeivel [22]. A kinetikai vizsgálatok során 3',5'-ditercbutil-katecholt alkalmaztak szubsztrátként, a tanulmányozott ligandumok közül az aszimmetrikus szerkezetűek bizonyultak aktívabbnak. Röntgenszerkezetvizsgálatok segítségével megállapították, hogy a fémionok környezete az aktív komplexekben erősen torzult, így a reaktivitásbeli különbségek elsődlegesen geometriai tényezőkkel magyarázhatóak.

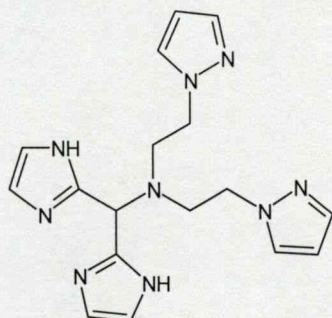
A legegyszerűbb imidazoltartalmú szénsav-anhidráz modellvegyület maga a $\text{Zn}(\text{imidazol})_3(\text{H}_2\text{O})$ cink(II)komplex. A koordinált víz deprotonálódása ebben a komplexben magasabb pH-n játszódik le ($\text{pK} = 8,0$), mint magában a natív enzimben ($\text{pK} \sim 7,5$) [23]. A Clewley és munkatársai által szintetizált bisz(1-metilimidazol-2-ilmetil)etilamin (1. ábra, X) $\text{ZnL}(\text{H}_2\text{O})$ komplexének deprotonálódására 33 %-os etanol-víz elegyben 8,16-as értéket mértek, amely a becslések szerint vízben 7,8 körüli [8]. Kimura és munkatársai makrociklusos tri- és tetraaminok cink(II)komplexeit vizsgálata során megállapították, hogy az 1,5,9-triazaciklododekán (1. ábra, XI) cink(II)komplexe szerkezetileg és funkcionálisan is az enzim egyik legjobb modelljének tekinthető [24]. Ebben a nem imidazoltartalmú komplexben a koordinált vízmolekula pK -ja (7,3) szinte megegyezik az enzim ezen értékével.



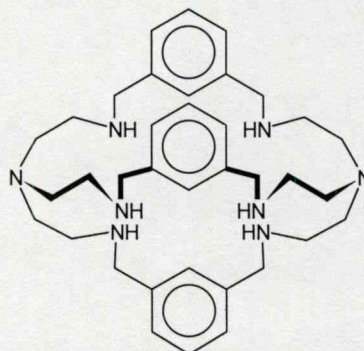
2,2'-bis-(4-metilimidazol-5-ilmetilszulfanil)bifenil (I)



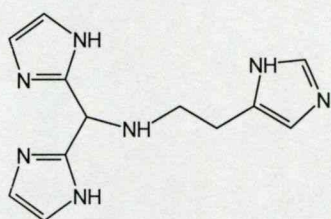
2,2'-bis-(2-piridil-metilszulfanil)bifenil (II)



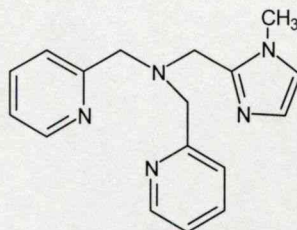
1,5-bisz(1-pirazolil)-3-(bis(2-imidazolil)metil)azapentán (III)



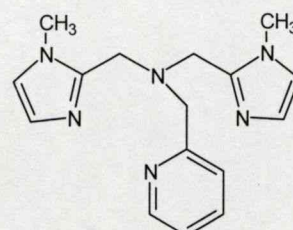
makrobiciklusos kriptand (IV)



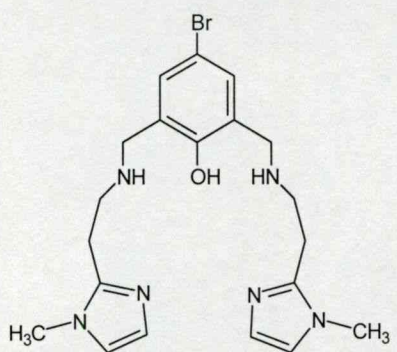
bisz(1,1'-imidazol-2-il)
(4-imidazol-4(5)-il)-2-azabután
(V)



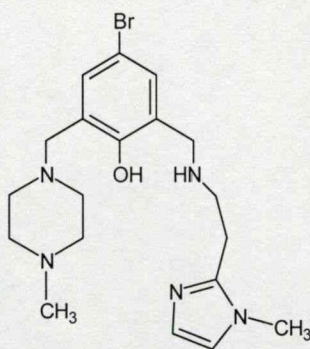
(bis(2-piridil)metil)
((1-metilimidazol-2-il)metil)amin
(VI)



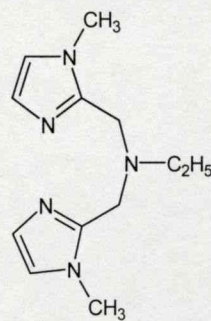
(bis(1-metilimidazol-2-il)metil)
((2-piridil)metil)amin
(VII)



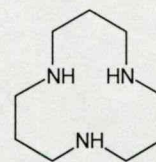
4-bromo-2,6-bisz[[2-(1-metil-2-imidazolil)
etil]aminometil]fenol
(VIII)



4-bromo-2-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-6-
[[2-(1-metil-2-imidazolil)etil]aminometil]fenol
(IX)



bisz(1-metilimidazol-
2-ilmetil)etilamin
(X)



1,5,9-triazaciklododekán
(XI)

1. ábra Modellvegyületek a réz- és cinkproteinek köréből

2.3. Imidazolszármazékok komplexképző sajátosságai

Az imidazolgyűrű biológiai jelentőségének megfelelően nagyszámú publikáció született a hisztidintartalmú di- és tripeptidek, valamint hisztamintartalmú pszeuropeptidek átmenetifémkomplexeinek koordinációs kémiai vizsgálata terén (pl. hisztidil-glicin [25-27], glicil-hisztidin [25-27], glicil-glicil-hisztidin [28-30], hisztidil-hisztidin [31,32], hisztamin tartalmú pszeuropeptidek [33-37]). A komplexképző sajátságokat illetően a hisztidin (így az imidazolgyűrű) helyzete a peptidláncban alapvető jelentőségű, minthogy ez a legtöbb esetben meghatározó a ligandum egyéb donorcsoportjainak koordinációs lehetőségeit illetően [38, IV. fejezet]. Emellett a koordinációban jelentős szerep jut a deprotonált amidnitrogénnek, melynek pK-ját a fémkoordináció jelentősen lecsökkenti. Maga az imidazolgyűrű keláttípusú koordináció esetén az N³-as nitrogénjének (piridines nitrogén) nemkötő elektronpárja révén koordinálódik, míg az N¹-es nitrogén (pirrolos nitrogén) a szabad ligandumban pH ~ 14 körül deprotonálódik. Fémion jelenléte azonban jelentősen lecsökkenti a pirrolos nitrogén pK-ját, amely két okra vezethető vissza: (1) az imidazolgyűrű N³-as nitrogénjének koordinálódása megváltoztatja a gyűrű elektroneloszlását, így a pirrolos nitrogén pK-ja például réz(II) jelenlétében 2-3 nagyságrenddel csökken; (2) a pirrolos nitrogénhez történő közvetlen fémkoordináció – amely imidazoláthidas oligomer komplexek kialakulását eredményezi – a csoport pK-ját az előbbinél jelentősebb mértékben, 4-5 nagyságrenddel csökkenti.

Az N-terminális helyzetben hisztidint tartalmazó dipeptidekben az amino- és az imidazolnitrogének hisztaminszerű koordinációja ligandumfelesleg esetén kizárja az amidnitrogén kötődésének lehetőségét. Mindamellet réz(II)ionok esetén - ekvimoláris oldatokban - glicilglicinszerű koordináció is megvalósulhat, amelynek eredményeképpen imidazolhidas kétmagvú komplexek képződnek. Amennyiben a peptidlánc eggyel hosszabb (His-Gly-Gly), abban az esetben a kialakuló telített koordinációs szférának köszönhetően az előbb említett dimer komplexek szétesnek [39]. A C-terminális helyzetben hisztidint tartalmazó dipeptidekben azonban az imidazolnitrogén koordinációja elősegíti az amidcsoport részvételét a komplexképződési folyamatban, melynek során stabilis, {N_{am}, N⁻, N_{im}} koordinációval bíró MLH₁ összetételű komplexek alakulnak ki. Várnagy és munkatársai eredményei alapján a peptidlánc hosszának növekedésével a láncvégi imidazolgyűrű egyre kisebb stabilitású makrokelátot alakít ki, majd a penta- és hexapeptidekben teljesen kiszorul a koordinációs szférából [40]. A réz(II)-His-His rendszerben az N- és a C-terminális analógokra jellemző komplexek is jelen vannak, már savas pH-n hisztamin típusú koordinációval rendelkező CuLH összetételű komplex képződik (mint a His-Gly esetén),

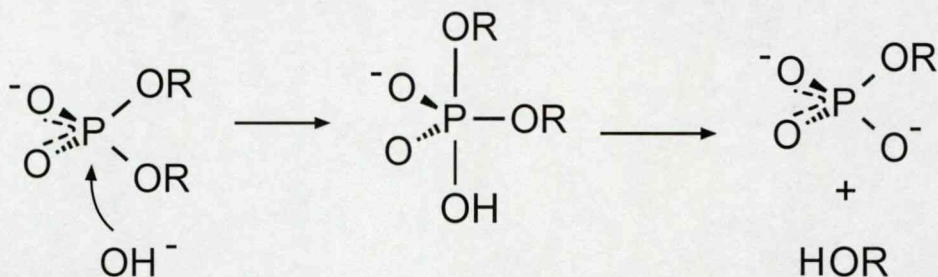
majd a pH növelésével először a Gly-His-re jellemző CuL komplex alakul ki nagyobb mennyiségben, majd pH=7-8 környékén egy Cu₂L₂H₂ összetételű kétmagvú részecske, amelyben a korábban még szabad imidazolgyűrű hídkepző koordinációja alakítja ki a létrejövő dimer szerkezetet.

A hisztidin- és a hisztamintartalmú (pszeudo)peptidek mellett változatos szerkezettel rendelkező imidazolszármazékok koordinációs kémiai vizsgálatára vonatkozóan is találunk példát az irodalomban. Tang és munkatársai bisz(imidazol-2-il)metán alegységet tartalmazó ligandumokat állítottak elő, az egyensúlyi vizsgálatok eredményei alapján [41,42] réz(II)-, cink(II)- és nikkel(II)ionokkal nagy stabilitású ML és ML₂ összetételű komplexek képződnek a kialakuló hattagú kelátgyűrűnek illetve az imidazolgyűrűk erős π -akceptor sajátságának köszönhetően. Várnagy és munkatársai megállapították, hogy amennyiben a ligandum erősen koordinálódó donorcsoportot tartalmaz oldalláncában (pl. aminocsoport {bisz(imidazol-2-il)metilamin} vagy hisztidin {Bu^tOCO-Pro-His-Gly-NHCH(imidazol-2-il)₂} [42]), a komplexképződést az kismértékben befolyásolja, de alapvető változást a koordinációban nem eredményez az alapvegyülethez képest. Reedijk és munkatársai változatos szerkezetű szintén bisz(imidazol-2-il)metil-amin típusú (köztük három- illetve négy imidazolgyűrűvel rendelkező) ligandumokat és ezek réz(II)komplexeit állították elő (ClO₄⁻, NO₃⁻ illetve BF₄⁻ ellenionokkal) egykristály formájában [17-19]. A négyfogú, három imidazolgyűrűvel rendelkező biib – melynek vizes oldatban történő komplexképződésének vizsgálatával jelen dolgozat is foglalkozik – réz(II)ionokkal etanolos közegben imidazolhidas Cu₂L₂ összetételű komplexet képez. Metilén-csoporton keresztül láncszerűen kapcsolódó, három- és négy imidazolgyűrűs ligandumok és különböző geometriájú rézkomplexeik előállítására Cl⁻ és ClO₄⁻ ellenionokkal Mulliez nevéhez fűződik [43]. Ezen poliimidazolszármazékok egyensúlyi és oldatbeli szerkezetének vizsgálatát kutatócsoportunk végezte el [44]. Az eredmények alapján réz(II)- illetve cink(II)ionokkal rendkívül stabil ML és ML₂ összetételű törzskomplexek alakulnak ki. Lineáris szerkezetű, imidazolcsoport(ka)t is tartalmazó (poli)amino-származékok előállítására és fémkomplexeik tanulmányozására is számos példa található az irodalomban [45-47]. A bisz(imidazol-2-il) típusú és a lineáris szerkezetű imidazolszármazékok mellett az imidazoltartalmú ligandumok további jelentős csoportját a tripodális ("háromlábú") imidazol donorcsoport(ka)t tartalmazó ligandumok alkotják [19,20,46,48]. Az ilyen típusú ligandumok számos kedvező tulajdonságnak köszönhetően különösen alkalmasak arra, hogy a rézproteinek elektromos és geometriai sajátságairól indirekt módon további információt nyerjünk. A négyfogú tripodális ligandumok ötös

koordinációjú, trigonális bipiramisos vagy négyzetes piramisos illetve a kettő közötti átmeneti szerkezetű komplexeket képeznek. A kialakuló struktúra nagymértékben függ a donorcsoportok és az ellenion minőségétől, a ligandum szimmetriájától és a kar nagyságától. Az eddig vizsgált tripodális ligandumok nagy része azonos vagy a központi atomtól ugyanazon távolságra elhelyezkedő donorcsoportokat tartalmazott, holott az élő szervezetben előforduló négyzetes piramisos szerkezetű komplexek képződése az eredmények alapján csak az aszimmetrikus struktúrájú molekuláktól várható [48-53].

2.4. A foszfoészterázok és modellvegyületeik

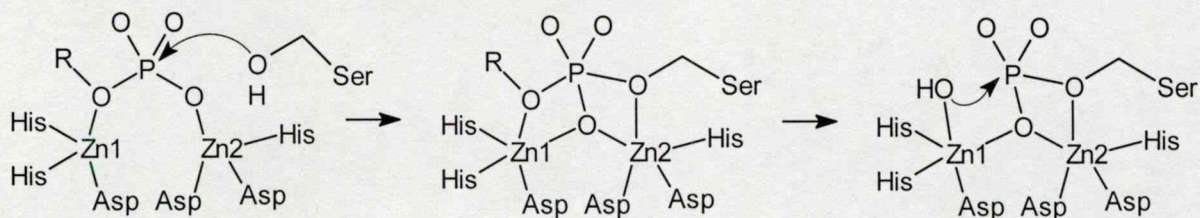
A foszfodiészterek hidrolízisének általánosan elfogadott mechanizmusát a 2. ábra mutatja. A hidroxidion nukleofil támadást hajt végre a parciális pozitív töltésű foszforatomon, amely trigonális bipiramisos szerkezetű foszforán intermedier kialakulását eredményezi, melynek stabilizálódása egy foszfor-oxigén kötés felhasadásával valósul meg. Az élő szervezetekben a foszfátészter kötés enzimatis hidrolízisének mechanizmusa az egyszerű báziskatalizált folyamathoz hasonlóan minden esetben S_N2 , amely leggyakrabban egy fémionhoz koordinált hidroxidnak a foszforatomon történő nukleofil támadása révén megy végbe.



2. ábra A foszfodiészterek hidrolízisének általánosan elfogadott mechanizmusa

A foszfátészterkötés hidrolízisét végző enzimeket szubsztrátspecifitásuk alapján csoportosíthatjuk. Eszerint monoészterázokat (foszfatázok) és diészterázokat különböztetünk meg [54]. A foszfatáz enzimek fontos szerepet töltenek be a metabolikus folyamatok szabályozásában, az enzimek aktiválásában és dezaktiválásában illetve a sejtek jelátadó mechanizmusában. A foszfomonoészterázok közé tartozik például az irodalomban részletesen tárgyalt alkáli-foszfatáz.

Az alkáli-foszfátázok olyan nem specifikus foszfomonoészterázok, amelyek – mint ahogy a nevük is mutatja – maximális aktivitásukat pH = 9-10 között érik el. Legismertebb képviselőjük az *E. coli* alkáli-foszfátáz, melynek aktív centrumában két Zn(II) és egy Mg(II) található. Az enzim működésére a 3. ábrán látható mechanizmust javasolták [55]. A foszfomonoészter először 1,3-hidas formában kötődik a két fémcentrumhoz, a Zn1-hez a monoészter észterkötésben lévő oxigénatomján keresztül. Egy a Zn2 által kialakított alkoholátion (szerin oldallánc) nukleofil támadása révén trigonális bipiramisos átmeneti állapot alakul ki, ahol a foszfát előzőleg a Zn2-höz koordinált oxigénatomja hídként köti össze a két fémiont és a szerin oxigénatomja a Zn2-höz koordinálódik. A foszfomonoészter Zn1-hez koordinálódott alkoholátionscsoportja eltávozik, majd a második lépésben a foszforilált szerin átmeneti komplexet a Zn1-hez koordinált hidroxidion nukleofil támadás révén hasítja és foszfátcsoport kialakulását eredményezi. Emellett mindkét trigonális bipiramisos átmeneti komplex hidrogén-hidas kötések révén is stabilizálódik. A mechanizmus érdekessége, hogy az egymást követő lépésekben a két fémion szerepe felcserélődik.

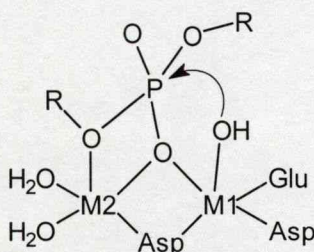


3. ábra Az alkáli-foszfátázok működésére javasolt reakciómechanizmus

A nukleázok a foszfodiészteráz enzimek legfontosabb alcsoportját alkotják. Feladatuk a nukleinsavak lebontása és módosítása, a DNS szakaszok javítása és a vírusok elleni védekezés. Modellrendszereik tanulmányozása nemcsak működési mechanizmusuk tisztázása érdekében folyik, hanem az ún. mesterséges nukleázok jelentékeny szerepet tölthetnek pl. a jövő biotechnológiájában, hiszen a nagy hidrolitikus aktivitású modellvegyületek oligonukleotid konjugáltjai alkalmasak lehetnek az RNS és DNS szekvenciaspecifikus hidrolízisére, ezáltal az ilyen típusú vegyületek tervezésére és előállítására fokozódó igény mutatkozik.

Az *E. coli* polimeráz I foszfodiészteráz aktivitással bíró 3',5'-exonukleáz egysége két fémiont (Mg, Mn, Zn vagy Co, melyeknél a fém-fém távolság kb. 4 Å) tartalmaz, melyek közül az M1 a szubsztrát távollétében is erősen kötődik a proteinhez, míg az M2 csak annak jelenlétében. A röntgenszerkezet és enzimkinetikai vizsgálatok alapján [56,57] az alábbi mechanizmus valószínűsíthető (4. ábra). A foszfodiészter 1,1-hidas formában kötődik meg, a

két fémiont egy karboxilát és a szubsztrát koordinálódó oxigénatomja köti össze, ezáltal a két fémion kooperatív együttműködése révén hatékonyabb elektrosztatikus aktiválás (kétszeres Lewis-sav aktiválás) valósul meg. A nukleofil támadást az M1 segítségével kialakuló hidroxidion hajtja végre, míg M2 a hozzá kötődő 3'-észteres oxigén révén a távozó csoport stabilizálásában vesz részt. Meglepő módon a két fémion együttműködése önmagában elegendő a foszfodiészter hidrolíziséhez, hiszen a mechanizmusban a protein egyetlen oldallánci csoportja sem vesz részt.



4. ábra *A DNS polimeráz I 3',5'-exonukleáz egységének működési mechanizmusa*

A foszfoészteráz enzimek természetes szubsztrátjai (főként a foszfodiészterázok esetén) a hidrolízissel szemben rendkívül ellenállóak, fiziológiás pH-n és 298 K hőmérsékleten a hidrolízis félélettartamát a monoalkilfoszfátoknál 8 évre [58], míg a dialkilfoszfátok esetében 200 millió évre becsülik [59]. Az előzőek alapján a modellvizsgálatok viszonylag nagy részénél a sokkal reaktívabb p-nitrofenil-észtereket használják. Ezek az úgynevezett aktivált, vagyis jó távozó csoportot tartalmazó foszfátészterek könnyebben vizsgálhatók és nagyságrendekkel olcsóbbak mint az ún. nemaktivált biológiai foszfátészterek (ld. 3.2.3. fejezet). Emellett az aktivált szubsztrátokkal kapott eredmények jó becslést jelentenek a nekik megfelelő, nemaktivált analógok hidrolízisére vonatkozóan. Figyelembe kell vennünk azonban azt is, hogy az egyes modellvegyületek nem feltétlenül segítik elő aktivált és nemaktivált foszfátészterek hidrolízisét is. Az eltérés főként akkor mutatkozik, amikor a biológiai foszfátészterek hidrolízisének sebességmeghatározó lépése az alkoholátcsoport távozása [60], hiszen a nitrofenolcsoport pK-ja kb. hét logaritmus egységgel kisebb, mint az alifás alkohol pK-ja.

A legtöbb foszfoészteráz enzimből, mint ahogy az a röntgenszerkezetvizsgálatok alapján megállapítható, kettő esetleg három, két- vagy háromvegyértékű fémion vesz részt a szubsztrát hidrolízisében, s így a nagy katalitikus hatékonyság, legalábbis részben a fémionok együttműködéséhez rendelhető. A fémionok a foszfátészterek hidrolízisét a következő módokon segíthetik elő:

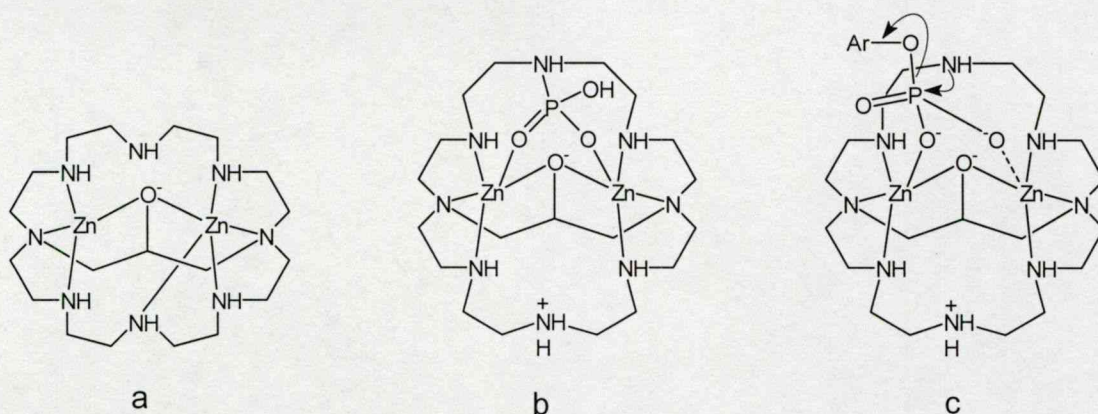
- koordináció révén aktiválják a szubsztrátot (Lewis-sav aktiválás) és kompenzálják annak negatív töltését
- ugyancsak koordináció révén részt vesznek az átmeneti komplex és a távozó csoport stabilizálásában
- semleges pH-n képesek a nukleofil támadást végrehajtó (koordinált) hidroxidion kialakítására.

A fenti sajátságok alapján, a fémionok illetve a fémkomplexek a jelenleg rendelkezésre álló leghatékonyabb nemenzimatis reagensek a foszfátészterek enyhe körülmények közötti hidrolízisében. A modellvizsgálatok kezdeti időszakában főként Co(III)komplexeket tanulmányoztak, később ezeket a kutatásokat igen nagyszámú fémionra kiterjesztették (Cu(II), Zn(II), Fe(III), La(III), Ce(IV), Zr(IV)). A Co(III) erős Lewis-sav jellege révén nagymértékben aktiválja a szubsztrátmolekulát, ligandumcseresebessége azonban lassú, így például egy Co(III)-hoz koordinált foszfodiészter hidrolízise inert foszfomonoészter komplex kialakulását eredményezi. Ezért a hidrolízis a Co(III) esetén általában nem katalitikus és ebből kifolyólag ezeknek a rendszereknek nincs nagy gyakorlati jelentősége a mesterséges foszfoészterázok tervezésében. Ennek ellenére a Co(III)komplexek tanulmányozása jelentékeny módon hozzájárult a fémion által indukált foszfátészter-hidrolízis megértéséhez, mivel a gyors szubsztrátcsere nem bonyolítja a kinetikai analízist.

A Co(III)komplexekkel ellentétben a kinetikailag labilis fémkomplexek gyors ligandumcserét biztosítanak és így némelyikük valódi katalitikus hatással rendelkezik. A Zn(II) erősebb komplexképző jellege, Lewis savassága és a fémionhoz koordinált vízmolekula előbbiekből adódó alacsony pK-ja, valamint jelenléte a natív foszfatazok aktív centrumában arra inspirálta a kutatókat, hogy nagyszámú cink(II)tartalmú kétmagvú mesterséges foszfatazt fejlesszenek ki. Ezzel ellentétben csak kevés Fe(III)ion tartalmú modellrendszert vizsgáltak. Ugyanakkor bár a Cu(II)- és a Ln(III)ionok biológiai szempontból nem relevánsak, kedvező kémiai sajátságaik néhány esetben rendkívül nagy hidrolitikus hatást eredményeznek fémkomplexeikben (a Cu(II) esetén 10^8 -szoros, míg a Ln(III)ionok esetében 10^{13} -szoros sebességnövekedés).

2.4.1. Modellezés aktivált foszfátészterekkel

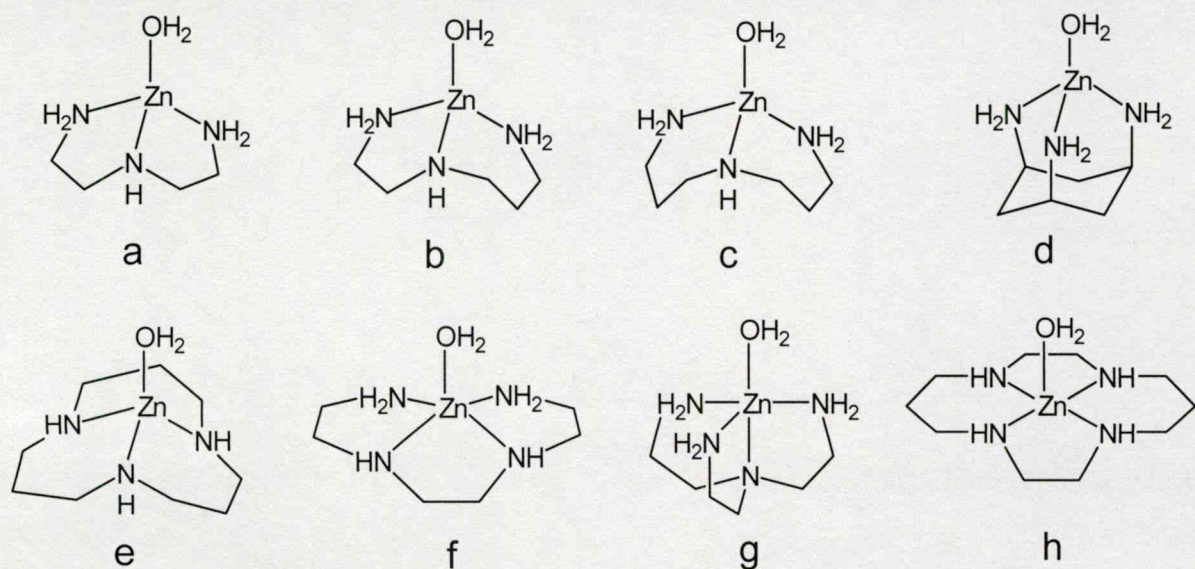
Kimura és munkatársai részletesen vizsgálták az 5.a ábrán látható oktaazakriptand kétmagvú alkoxo-hidas cink(II)komplexét, amely egyedülálló viselkedést mutat, hiszen szelektíven képes foszfomonoészterek hidrolízisét felgyorsítani [61]. Az alkoxo-hidas dimer kristályszerkezete két megegyező, trigonális bipiramisos cinkcentrum jelenlétét mutatta. A 4-nitrofenil-foszfát hidrolízisére kifejtett viszonylag jelentős hatás ($k_{\text{obs}} = 7,5 \times 10^{-6}$, pH = 6, T = 308 K és 5 mM komplex jelenlétében) a szekunder amin nukleofil támadása révén valósul meg. Meghatározták a létrejövő nagy stabilitású intermedier kristályszerkezetét is, amelyben a foszforamid oxigének 1,3-hidas formában kötődnek a fémcentrumokhoz (5.b ábra), így a reakció nem katalitikus. A reakció mechanizmusára az 5.c ábrán látható sémát javasolták, amelyben a szubsztrát hídként köti össze a két fémiont leszorítva azokról az axiálisan kötődő aminocsoportokat, majd ezek egyike nukleofil támadás hajt végre a foszforatomon, ami tulajdonképpen foszforil-transzfert eredményez.



5. ábra Kimura és munkatársai által tanulmányozott kétmagvú cink(II)komplex

Itoh és Fujii triamin és tetramin származékok cink(II)komplexeinek (6. ábra) hidrolitikus hatását vizsgálta a foszfortriészter 2,4-dinitro-fenil-dietil-foszfát hidrolízisére vonatkozóan [62,63]. Az aktív részecske $\text{ZnL}(\text{OH})$ összetételűnek adódott és azt tapasztalták, hogy a triamin-komplexek aktivitása jóval nagyobb, mint a tetramin-komplexeké. Az eredmények alapján a legnagyobb aktivitással az 1,5,9-triazaciklododekán cink(II)komplexe (6.e ábra) rendelkezik ($k_{\text{OH}} = 0,0225 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, T = 298 K, $v_r = k_{\text{OH}} \times [\text{ML}(\text{OH})][\text{észter}]$), illetve emellett a *cisz-cisz*-1,3,5-triaminociklohexán cink(II)komplexe (6.d ábra) is jelentős hidrolitikus aktivitással bír ($k_{\text{OH}} = 0,0197 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, T = 298 K). Megállapították, hogy a komplexek sebességi állandóinak logaritmusai lineárisan növekszik a koordinált víz pK-jának csökkenésével, valamint csökken a ligandumok komplexképző sajátságainak erősödésével.

Ezek alapján azt feltételezik, hogy először a foszfátészter a cink(II)ionhoz koordinálódik, melyet a fémhez koordinálódott OH^- csoport foszfátészteren történő nukleofil támadása követ.



6. ábra Tri- és tetraminszármazékok cink(II)komplexei (Itoh és Fujii)

Az aktívabbnak bizonyult triamin származékok réz(II)komplexeinek hidrolitikus hatását is tanulmányozták, a vizsgálatok során a foszfodiészter 2,4-dinitro-fenil-etil-foszfátot és az előbb említett foszfotriésztert alkalmazták szubsztrátként [62,64]. Az aktív részecske szintén $\text{ML}(\text{OH})$ összetételűnek adódott, a legnagyobb aktivitást pedig itt is az 1,5,9-triazacyclododekán fémkomplexe esetén tapasztalták ($k_{\text{OH}} = 8,35 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a foszfotriészter illetve $0,231 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a foszfodiészter esetén, $T = 298 \text{ K}$). Foszfodiészter felesleget (10-100 szoros) alkalmazva 10 %-os metanol-víz elegyben telítési kinetikai vizsgálatokat is végeztek és megállapították, hogy rendszer leírható a Michaelis-Menten-féle kinetika segítségével illetve a foszfátdiészter hidrolízise során képződő foszfátmonoészter – amely bár gyakran inhibitorként viselkedik – a vizsgált komplexek esetén nem fejt ki inhibíáló hatást ($k_{\text{kat}} = 2,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $K_{\text{M}} = 3,4 \times 10^{-2} \text{ M}$ a réz(II)–triazacyclododekán rendszerben illetve $k_{\text{kat}} = 2,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $K_{\text{M}} = 4,4 \times 10^{-2} \text{ M}$ a réz(II)–*cisz-cisz*-triaminociklohexán rendszer esetén, $\text{pH} = 8,1$ és $T = 298 \text{ K}$).

Trogler és munkatársai foszfátdiészterek – a 4-nitrofenil-etil-foszfát és a bisz(4-nitrofenil)foszfát – hidrolízisét tanulmányozta 348 K-en, a 2,2'-bipiridin $[\text{Cu}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ összetételű komplexe (7.b ábra) segítségével [65]. A 4-nitrofenil-etil-foszfát esetén több, mint 1000 katalitikus ciklust detektáltak, a bisz(4-nitrofenil)-foszfát hidrolízise pedig 6300-szor bizonyult gyorsabbnak az autohidrolízishez képest. Az aktív részecske $\text{CuL}(\text{OH})$

összetételűnek adódott, a telítési kinetikai vizsgálatok a Michaelis-Menten kinetikára jellemző viselkedést mutattak ($k_{\text{kat}} = 5,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $K_M = 4,7 \times 10^{-2} \text{ M}$) és egyben bizonyítékul szolgáltak a katalizátor–szubsztrát komplex kialakulására.

2.4.2. Modellvizsgálatok nemaktivált foszfátészterekkel

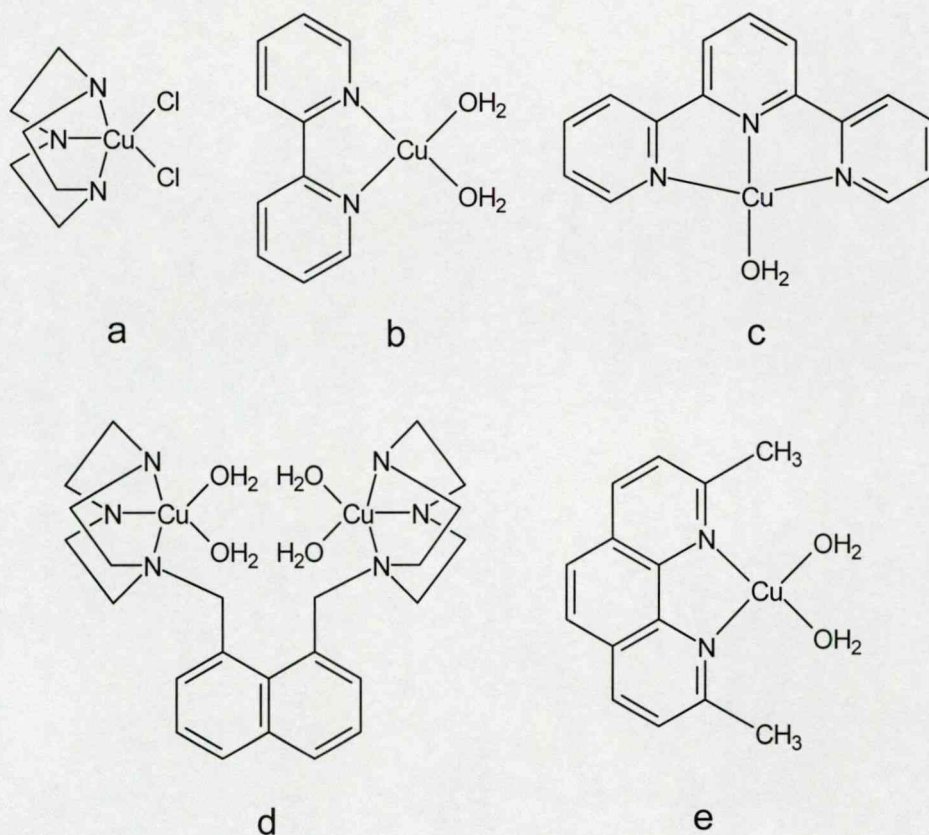
A DNS rendkívül ellenálló hidrolitikus szempontból, autohidrolízisének félélettartama kb. 200 millió év, míg az RNS kevésbé inert, félélettartama kb. ezer év, ami a nukleofil 2'-OH csoport intramolekuláris részvételével magyarázható. Ezen nagymértékű inertség ellenére bizonyos fémkomplexekkel a hidrolízis akár százmilliószorosára is felgyorsítható.

A fémkomplexekkel történő RNS-hidrolízis vizsgálatok kezdete 1990-re tehető. Elsőként magát a cink(II)akvaiont tanulmányozták, amely hatékonynak bizonyult az alkalmazott polinukleotid (poli(A)₁₂₋₁₈) hidrolízisére vonatkozóan [66]. Kuusela és Lönnberg átmenetifémionok és ciklikus poliaminokkal alkotott komplexeik hidrolitikus aktivitását tanulmányozták, a vizsgálatok során a ribonukleáz katalizálta RNS-hidrolízis közttermékét (a 2',3'-ciklikus-uridin-monofoszfátot; 2',3'-cUMP) alkalmazták szubsztrátként [67]. Eredményeik alapján az 1,5,9-triazaciklododekán MLH₁ összetételű cink(II)komplexe (6.e ábra) bizonyult a legaktívabbnak, amely közel három nagyságrenddel gyorsítja fel a 2',3'-cUMP autohidrolízisét. Burstyn és munkatársai az 1,4,7-triazaciklononán réz(II)komplexét (7.a ábra) RNS oligonukleotidok hidrolízisére vonatkozóan vizsgálták és megállapították, hogy fiziológiás pH-n (pH = 7,2) és hőmérsékleten (T = 310 K) a komplex mind az egyszálú, mind a kétszálú RNS-t hidrolitikus úton hasítja, valamint a komplex emellett hidroláz funkcióval is bír [68]. Chin és munkatársai ezen komplex kétmagvú változatát is előállították (7.d ábra), amely igen reaktívnak bizonyult az ApA hidrolízisét tekintve (1 mM komplex kb. 5 nagyságrenddel növeli meg az ApA hidrolízisét 6,6-os pH-n). Minthogy a kétmagvú komplex az előbbi egymagvú komplex monomer analógjának tekinthető, lehetőség nyílt a dupla Lewis-sav aktiválás előnyös voltának kvantitatív jellemzésére is, ez esetben a két fémion együttműködése mintegy 600-szoros sebességnövekedést eredményez [69].

Linkletter és Chin 1995-ben egy meglehetősen aktív modellvegyületet találtak [70], nevezetesen a neokuproin egymagvú réz(II)komplexét (7.e ábra), amely az ApA hidrolízisét 200-szor hatékonyabban segíti elő, mint a $[\text{Cu}(\text{trpy})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ komplex (7.c ábra) és 20000-szer aktívabb a 2,2'-bipiridin réz(II)komplexénél (7.b ábra). A vizsgált modellvegyület rendkívül nagy hidrolitikus aktivitással rendelkezik (10 mM komplex jelenlétében az ApA félélettartama mindössze 3 perc 7-es pH-n és 310 K-en), amely egyrészt azzal magyarázható,

hogy a metilcsoportok térgátló hatása teljesen visszaszorítja az analóg 2,2'-bipiridin komplexre jellemző dihidroxo-hidas dimerizációt illetve a terpiridin esetén a telítettebb koordinációs szférának köszönhetően monoakvakomplex képződésére nyílik csak lehetőség, amely egyidejűleg jóval kisebb valószínűséggel képes megkötni a nukleofil támadást végrehajtó hidroxidiont és a foszfátésztert.

Az irodalomban elsőként 1987-ben számoltak be fémion által elősegített DNS-hidrolízis vizsgálatokról [71]. Burstyn és munkatársai az 1,4,7-triazaciklononán réz(II)komplexét (7.a ábra) hatékonynak találták az egyszálú és a kétszálú DNS (pH = 7,8, T = 323 K) aerob, sőt anaerob körülmények között megvalósított hidrolízisére egyaránt [72]. Megjegyzendő, hogy nagyon kevés azon jól definiált fémkomplexek száma, melyek hidrolitikus, tehát nem oxidatív úton képesek hasítani a DNS-molekulát. Itoh és Fujii triaminok (6. ábra) réz(II)komplexeinek hidrolitikus hatását vizsgálták, melyek közül csak a *cisz-cisz*-triaminociklohexán réz(II)komplexe bizonyult hatékonynak a DNS nem oxidatív úton megvalósított hidrolízisére ($k_{\text{kat}} = 4,34 \text{ h}^{-1}$, pH = 8,1, T = 308 K) [73].



7. ábra Az RNS- és a DNS-hidrolízis réz(II)tartalmú modellvegyületei

3. Kísérleti rész

3.1. Felhasznált anyagok

A vizsgált ligandumok egyszerűsített szerkezetei a 8. ábrán láthatóak. A 4-amino-imidazol-karboxamid és a 4-imidazol-ecetsav Aldrich termékek voltak, a 2,2'-bisz-imidazol előállítását pedig Bernarducci és munkatársai által leírt módon végeztük el [74]. Az anyagok tisztaságát ^1H -NMR vizsgálattal és potenciometriás titrálással ellenőriztük. A biib névvel rövidített ligandumot és $[\text{M}_2\text{L}_2(\text{ClO}_4)_2] \times 2\text{ClO}_4$ összetételű egykristály réz(II)komplexét Jan Reedijk bocsájtotta rendelkezésünkre [19].

Az *N,N'*-bisz(imidazol-4-ilmetil-5-metil)-hisztamin előállítása a következő módon történt: 0,921 g (5 mmol) hisztamin-dihidrokloridot 30 cm^3 vízmentes metanolban oldottunk, kálium-hidroxiddal semlegesítettük és fél órás kevertetés után a kivált kálium-klorid csapadékot szűrőssel eltávolítottuk. A hisztamin leszűrt oldatához 1,101 g (10 mmol) 5-metilimidazol-4-karboxaldehid vízmentes metanolos oldatát (30 cm^3) öntöttük. Az így kapott oldathoz keverés közben 0,8 g nátrium-borohidridet adtunk kis részletekben, majd 48 óráig kevertettük (először szobahőmérsékleten, az utolsó 18 órában pedig $40\text{ }^\circ\text{C}$ -on) és 12 óráig refluxáltattuk. Ezután tömény sósavval megsavanyítottuk és a kivált csapadékot leszűrtük. A kapott oldatot bepároltuk ($2\text{--}3\text{ cm}^3$ -re), 30 cm^3 metanolt adtunk hozzá és a kivált csapadékot újból leszűrtük, majd vízmentes etanol hozzáadása után szárazra pároltuk. Az így kapott terméket metanol segítségével átkristályosítottuk, a kitermelés 66 %-osnak (1,47 g) adódott. Az anyag tisztaságát ^1H -NMR vizsgálattal és potenciometriás titrálással ellenőriztük. A vizes közegben mért ^1H -NMR eredménye: $\delta = 8,497$ (d, $^4J \sim 0,8\text{ Hz}$, 1 H, $\text{C}^2_{\text{hm}}\text{H}$), 8,468 (s, 1 H + 1 H, $\text{C}^2_{\text{im}}\text{H}$), 7,125 (s, széles, 1 H, $\text{C}^5_{\text{hm}}\text{H}$), 3,813 (s, 2 H + 2 H, im- CH_2 -NH), 2,890 (m, 2 H + 2 H, NH- CH_2 - CH_2 -hm), 2,213 (s, 6 H, CH_3 -im).

A bimdm és az mbimdm névvel rövidített ligandumokat Jean-Baptiste Verlhac bocsájtotta rendelkezésünkre [47], a hisztamin-dihidroklorid pedig Fluka termék volt. Az *N,N'*-di-*L*-hisztidiletán-1,2-diamint Tóth Gábor és munkatársai (ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet) állították elő, az anyag tisztítását mi végeztük el. Az előállítás a következő lépésekben történt:

a., $\text{N}^\alpha, \text{N}^{\text{im}}$ -di(*tert*-butoxikarbonil-*L*-hisztidin (Boc_2His) előállítása: 31,45 g (150 mmol) *L*-hisztidin-hidroklorid-hidrátot keverés közben 80 cm^3 acetont, 40 cm^3 vizet és 76 cm^3 $\text{Me}_3\text{COC}(\text{O})\text{OC}(\text{O})\text{OCMe}_3$ (330 mmol) elegyében feloldjuk. 2 óráig szobahőmérsékleten kevertetjük, majd az acetont bepárlással eltávolítjuk és a maradék vizes fázist *n*-hexánnal

extraháljuk. Az így kapott oldatot 10 %-os KHSO_4 vizes oldatával és etil-acetát segítségével két fázisra osztjuk, a szerves fázist Na_2SO_4 -tal szárítjuk és bepároljuk. Az olajszerű termék homogenitását vékonyréteggromatográfiás vizsgálatok alapján ellenőrizhetjük.

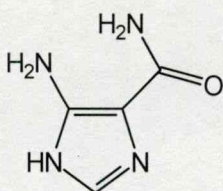
b., $\text{N}^\alpha, \text{N}^{\text{im}}$ -di(*tert*-butoxikarbonil-L-hisztidil)etán-1,2-diamin ($\text{Boc}_2\text{His-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-HisBoc}_2$) előállítása: 50 mmol $\text{Boc}_2\text{His-t}$ 50 cm^3 vízmentes kloroformban feloldunk, 0 °C-ra hűtjük és 8,66 g (42 mmol) diciklohexil-karbodiimidet illetve 5,67 g (42 mmol) 1-hidroxi-1*H*-benzotriazolt adunk hozzá. A reakcióelegyet 0 °C-on 10 percig kevertetjük, majd 1,13 cm^3 etán-1,2-diamint csepegtetünk hozzá. Ezután 2 óráig szobahőmérsékleten kevertetjük, a kivált diciklohexil-ureát leszűrjük, a maradékot bepároljuk, etil-acetátban feloldjuk, végül pedig 5 % KHCO_3 -ot és 5 % KHSO_4 -ot tartalmazó vizes oldattal extraháljuk. A szerves fázist Na_2SO_4 -tal szárítjuk és bepároljuk. Az olajszerű terméket etil-acetát és *n*-hexán elegyének segítségével átkristályosítjuk (A kitermelés 57 % (2,1 g).

c., Védőcsoporteltávolítás: 1,1 g $\text{Boc}_2\text{His-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-HisBoc}_2$ -t 10 cm^3 1,5 M-os sósav ecetsavas oldatában oldjuk 0 °C-on, 30 percig kevertetjük, az ecetsavat bepárlással eltávolítjuk és a maradékot dietil-éterrel kicsapjuk. A kristályos terméket leszűrjük, metanol és dietil-éter segítségével átkristályosítjuk (A kitermelés 71 % (0,51 g). Tömegspektrometriás, NMR és HPLC-vizsgálatok alapján így tiszta anyaghoz juthatunk. A HPLC-mérések során Lichrosorb 7RP18 oszlopot, mozgófázisként 0,1 % $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ tartalmú vizes oldatot használtunk, az áramlási sebesség 0,8 ml/perc volt, $t_R = 8,2$ perc. A vizes közegben mért $^1\text{H-NMR}$ eredménye: 8,645 ppm ($\text{C}_{\text{im}}^2\text{-H}$), 8,410 ppm (NH_{amid}), 7,378 ppm ($\text{C}_{\text{im}}^5\text{-H}$), 4,208 ppm ($\text{C}^*\text{H}_{\text{hiszt}}$), 3,314 ppm ($\text{CH}_{2,\text{hiszt}}$) és 3,251 ppm ($\text{CH}_{2,\text{en}}$).

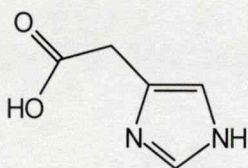
A tdc_i és tmc_i névvel rövidített ligandumokat Hegetschweiler és munkatársai szintetizálták a saarbrückeni egyetemen, nehézkes és veszélyes köztitermékek képződésével járó előállításukat a 90-es évek elején dolgozták ki [75].

A hidrolitikus aktivitás tanulmányozása során használt aktivált foszfátészterek, nevezetesen a 4-nitrofenil-foszfát (npp) és a bisz(4-nitrofenil)-foszfát (bnpp) Fluka illetve nemaktivált foszfátészterek csoportjába tartozó 2',3'-cUMP Sigma termékek voltak. A 2,4-dinitrofenil-etil-foszfát (dnpep) előállítása Moss és munkatársai által leírt módon történt [76]. A pH állandó értéken tartásához használt biológiai pufferek [mes (pH = 5,5-6,7), hepes (pH = 6,8-8,2), ches (pH = 8,6-10,0) illetve caps (pH = 9,7-11,1)] Aldrich termékek voltak. A spektroszkópiás és a kinetikai mérések során a pH-mérő kalibrálása 4,00-es, 7,00-es és 10,00-es pH-jú ($\pm 0,01$) kereskedelmi forgalomban kapható standard pufferekkel (Sigma) történt.

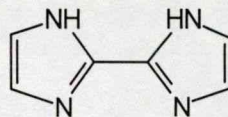
A katecholokkal történő vegyesligandumú komplexképződés tanulmányozásához a Sigma cég által forgalmazott dopamint és L-dopa-t használtuk. A fémoldatok készítéséhez használt Cu(II)-, Zn(II)-, és Ni(II)sók (többnyire ClO_4^- , de Cl^- illetve NO_3^- is) Fluka termékek voltak. Az elkészített oldatok koncentrációját komplexometriás titrálással határoztuk meg. A szükséges egyéb anyagokat (pl. K-H-ftalát, ionerősség beállító sók, D_2O , oldószerek) a Reanal, Sigma, Fluka vagy Aldrich cégektől vásároltuk.



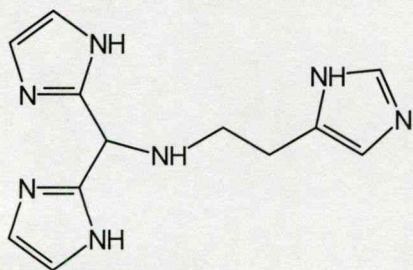
4-amino-imidazol-karboxamid (**aic**)



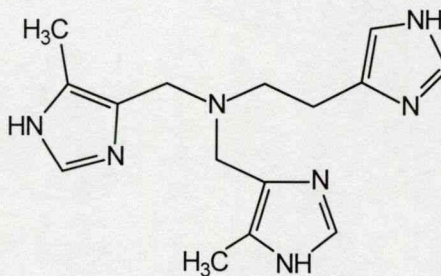
4-imidazol-ecetsav (**iaa**)



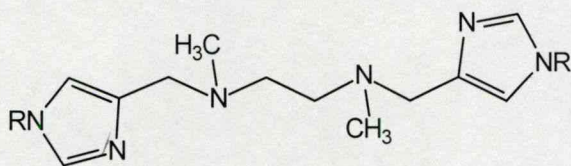
2,2'-bisz-imidazol (**biim**)



bisz(1,1'-imidazol-2-il)
(4-imidazol-4(5)-il)-2-azabután (**biib**)



N,N'-bisz(imidazol-4-ilmetil-5-metil)-hisztamin
(**bimha**)

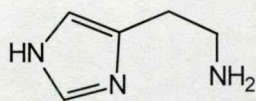


(1) R = H

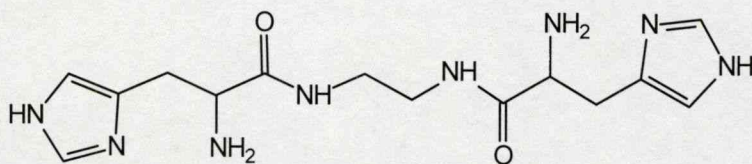
(2) R = CH₃

N,N'-dimetil-N,N'-bisz(1-metil-imidazol-4-ilmetil)-etán-1,2-diamin (1) (**bimdm**)

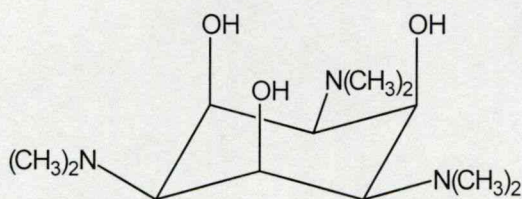
N,N'-dimetil-N,N'-bisz(imidazol-4-ilmetil)-etán-1,2-diamin (2) (**mbimdm**)



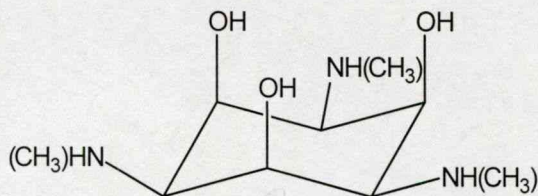
hisztamin (**ha**)



N,N'-di-L-hisztidiletán-1,2-diamin (**dhen**)



1,3,5-tridezoxi-1,3,5-trisz(dimetilamino)-
cisz-inozitol (**tdci**)



1,3,5-tridezoxi-1,3,5-trisz(metilamino)-
cisz-inozitol (**tmci**)

8. ábra A vizsgált ligandumok egyszerűsített szerkezetei

3.2. Az alkalmazott vizsgálati módszerek

3.2.1. Potenciometriás titrálások

A ligandumok protonálódási állandóit és a fémkomplexek képződési állandóit pH-metriás titrálások értékelésével kaptuk meg. A méréseket $25,0 \pm 0,1$ °C-ra (illetve a dhen és a ha esetén 90 ± 1 °C-ra is) termosztált, zárt mérőedényben, állandó ionerősség mellett (0,1 M) hajtottuk végre, a szén-dioxid és a molekuláris oxigén távoltartására nagy tisztaságú argon gázt buborékoltattunk át a vizsgálandó oldaton. A titrálásokhoz 0,1 M koncentrációjú karbonátmentes NaOH-oldatot használtunk, melyet a Merck cég Titrisol márkanévű lúgkoncentrumának hígításával vagy exszikkátorban tartott szilárd NaOH (Fluka) segítségével készítettünk el, mindkét esetben frissen kiforralt és lehűtött kétszer desztillált vizet használtunk, melyen előzőleg Ar-gázt buborékoltattunk át. A zárt edényben, Ar atmoszféra alatt tartott NaOH-oldat pontos koncentrációját $0,05 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftaláttal határoztuk meg. A mérőoldat adagolásához és az adatok rögzítéséhez számítógéppel vezérelt Metrohm 665 Dosimat típusú automata titráló berendezést, az elektródpotenciál illetve a pH mérésére Orion 710 A pH/mV-mérőt és Orion 8102 BN illetve Metrohm AG 9101 típusú kombinált üvegelektrodot használtunk.

(A reprodukálhatóság: $\pm 0,1$ mV illetve 0,004 pH egység.)

Az elektród kalibrációs paramétereit egy gyenge egyértékű bázis [trisz-(hidroximetil)-amino-metán; tris] és egy erős sav (perklórsav illetve sósav, az alapelektrolittól függően) elegyének titrálásával határoztuk meg. A kalibrációt minden mérés előtt elvégeztük, az összetartozó mérőoldat fogyás – potenciál értékpárokból a módosított Nernst-egyenlet [77]

$$E = E_0 + K \times \lg [H^+] + J_H \times [H^+] + J_{OH} \times K_w / [H^+] \quad (1)$$

paramétereit (E_0 , K , J_H és J_{OH}) nemlineáris legkisebb négyzetes paraméterbecsléssel határoztuk meg, ahol:

E_0 – a rendszer normál (vagy formál) potenciálja

J_H és J_{OH} – az elektród savas és lúgos hibáját jellemző paraméterek

K_w – a vízionszorzat ($pK_w = 13,75$; $T = 25$ °C és $I = 0,1$ M)

$K = (RT / nF) \times 2,303$

R – az egyetemes gázállandó ($\text{Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$)

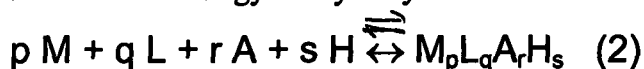
T – a hőmérséklet (K)

n – az elektronszámváltozás az elektródfolyamatban

F – Faraday-állandó (96487 C/mol)

A kalibrációs adatok segítségével a mért potenciálértékekből az egyenlet $[H^+]$ -ra történő megoldásával nyerjük az összetartozó mérőoldat – pH értékpárokat.

A vizsgált rendszerekben keletkező különböző összetételű részecskék képződése a következő általános egyensúlyi folyamattal értelmezhető:



(ahol "A" a terner redszerekben használt másik ligandumot jelöli)

A töltéseket az egyszerűség kedvéért a továbbiakban is elhagyjuk és nem jelöljük a fémionhoz kötődő vízmolekulát sem (amelyek a fémion koordinációs szférájának telítettségét biztosítják). A fenti általánosított részecskének a képződési állandója β_{pqrs} . A ligandumok protonálódási állandóit a SUPERQUAD [78] nevű számítógépes programmal határoztuk meg, a komplexképződési állandók számítására a PSEQUAD [79] számítógépes programot használtuk fel. A ligandumok törzsadatainak titrálása során kapott adatokból a protonálódási állandók meghatározása mellett a SUPERQUAD nevű programmal egyúttal a ligandumok tisztaságát is ellenőrizhetjük. A PSEQUAD nevű program megadja a feltételezett részecskék képződési állandóit, azok hibáját (az eredmények közlésekor a zárójelben szereplő szám a közölt érték utolsó számjegyét terhelő hibát jelenti), a kísérleti és a számított görbék eltérését jellemző illesztési paramétert és egy adott komponensre vonatkozóan kirajzolja az asszociátumok koncentrációeloszlási görbét a pH függvényében. Egy adott rendszer modelljének a feltételezett asszociátumok összességét nevezzük és azt a modellt tekintjük a rendszert leírónak, amely kémiai megfontolások alapján értelmezhető és amelynél az illesztési paraméter a legkisebb. A pH-metria által szolgáltatott információk alapvető fontosságúak a komplexkémiai vizsgálatokban, de sok esetben nem lehet csak ez alapján egyértelmű következtetéseket levonni. Abban az esetben, ha két részecske képződése azonos pH-effektust eredményez, akkor csupán a pH-metria segítségével nem tehetünk különbséget a részecskék között. Előfordulhat az is, hogy ugyanaz a rendszer több kémiaiilag reális modellel is egyformán jól leírható, melyek közül csupán elvi megfontolások alapján egyik sem vethető el. Ezért a pH-metriás adatok kiértékelésekor minden esetben független, döntően spektroszkópiás (UV-látható, CD, ESR, NMR) vizsgálatokra is támaszkodtunk. A 90 °C-on végzett pH-metriás mérések kivitelezése során 0,05 M-os hepes pufferrel kalibráltuk a pH-mérő – elektród rendszert ($pK = 6,6$, ha $T = 363 \text{ K}$ [80]) és ideális Nerst-i funkciót feltételeztünk. Ezen a hőmérsékleten a $pK_w = 12,07$ [81], a meghatározott képződési állandók a kísérleti körülmények miatt jóval nagyobb hibával terheltek és mindenképpen kritikusan kezelendők.

A protonálódási állandókat általában 4-5, a komplexképződési állandókat 6-10 független titrálásból határoztuk meg (kb. 70-80 mérési pont titrálásonként). 90 °C-on kevesebb mérést végeztünk, a protonálódási állandókat 2-3, a komplexképződési állandókat 4-5 független titrálásból számoltuk. A 4-amino-imidazol-karboxamid és a 4-imidazol-ecetsav esetén a fém–ligandum arány 1:1 és 1:6, a ligandumkoncentráció 2×10^{-3} és 1×10^{-2} mol/dm³ között változott. Mivel a 2,2'-bisz-imidazol oldhatósága meglehetősen kicsi vízben, ezért a titrálásokat a megszokott 5-10 cm³ oldattérfogat helyett 100 cm³-es térfogatokban végeztük ([L] = 4×10^{-4} M), a fém–ligandum arány 1:1 és 1:4 között változott. A biib névvel rövidített ligandum esetén csak réz(II)tartalmú ekvimoláris és kétszeres fémelesleget tartalmazó rendszereket vizsgáltunk, mivel nem állt kellő mennyiségű ligandum a rendelkezésünkre és ezért méréseinket [Cu₂L₂(ClO₄)₂]·2ClO₄ összetételű egykristály segítségével tudtuk csak elvégezni. A protonálódási állandókat 0,004 M-os ligandumoldattal határoztuk meg, a komplexképződési állandókat az egykristály perklórsavas oldata segítségével, amely a ligandumra nézve szintén 0,004 M-os volt. A bimdm és az mbimdm névvel rövidített ligandumok esetén ([L] = 0,004 M) 1:4, 1:2 illetve 1:1 fém–ligandum arányt alkalmaztunk. Mivel a katecholokkal történő vegyesligandumú komplexképződés leírásához szükségünk van a törzsrendszerek pontos ismeretére, ezért újra meghatároztuk a dopamin és az L-dopa protonálódási és komplexképződési állandóit az általunk alkalmazott kísérleti körülmények mellett ([L] = 0,004 M, az alkalmazott fém–ligandum arány 1:4, 1:2 illetve 1:1 volt). Mivel mind az imidazoltartalmú ligandumok, mind a katecholaminok többféleképpen koordinálódhatnak, vagyis a képződő vegyesligandumú komplexekre többféle szerkezet is elképzelhető, ezért modellrendszerek vizsgálata is szükségessé vált, melyeknél szintén elsődlegesen szükségünk volt a törzsrendszerek általunk alkalmazott kísérleti feltételek melletti leírására. A glicin esetén ([L] = 0,005 M) 1:2 és 1:4 fém–ligandum arányt alkalmaztunk, a hisztaminnál ([L] = 2×10^{-3} – 1×10^{-2} M) ez az arány 1:8 és 1:1 között változott. A vegyesligandumú rendszerek tanulmányozása során 1:2:2, 1:1:2 és 1:1:1 fém–ligandum¹–ligandum² arány mellett határoztuk meg a képződési állandókat ([M] = 0,003 M, L¹ = bimdm, mbimdm, hisztamin, L² = dopamin, L-dopa, glicin). Az N,N'-di-L-hisztidiletán-1,2-diamin esetén az 1:2 és 1:1 fém–ligandum arányok mellett lehetőségünk nyílt 2:1 rendszerek tanulmányozására is ([L] = 2×10^{-3} – 1×10^{-2} M). Az általunk szintetizált N,N'-bisz(imidazol-4-ilmetil-5-metil)-hisztaminnál ([L] = 1×10^{-3} – 3×10^{-3}) 1:1 és 1:2 fém–ligandum arányt alkalmaztunk.

3.2.2. Spektroszkópiás vizsgálatok

Az UV/VIS abszorpciós spektrumokat Hewlett Packard 8452A típusú diódasoros, valamint az Ocean Optics cég által forgalmazott S2000/PC2000 típusú spektrofotométeren vettük fel. A réz(II)komplexek egyedi színeképeit a PSEQUAD programmal számítottuk. A CD (cirkuláris dikroizmus) színeképeket Jobin Yvon CD6 típusú spektropolariméteren regisztráltuk a 230-800 nm hullámhossztartományban. A CD intenzitásokat, a jobbra és a balra cirkulárisan polarizált fény abszorpciója közötti különbséggént, a teljes fémion-koncentrációra vonatkoztatva $M^{-1}cm^{-1}$ egységben adtuk meg. Az optikai úthosszat a spektrofotometriás (az aktivált foszfátészterekkel végzett kinetiai mérések is ide tartoznak) vizsgálatok és a CD-spektrumok felvétele során az adott rendszertől és hullámhossztartománytól függően változtattuk: 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2 illetve 3 cm-es úthosszal rendelkező kvarcküvetéket használtunk, az állandó hőmérsékletet termosztálható küvetatartó segítségével biztosítottuk.

Az ESR-spektrumokat JEOL-JES-FE 3X spektrométeren vettük fel 77 és 298 K hőmérsékleten az X sávban 100 kHz modulációval. A mérések során a mágneses tér hitelesítése MgO-hordozóra felvitt mangán(II)ion vonalai segítségével történt. Az ESR-paraméterek számításához Rockenbauer Antal és munkatársai által kifejlesztett számítógépes programot használtunk [82], amely alkalmas több (ideálisan két) egyidejűleg jelenlévő részecske spektrumának kezelésére.

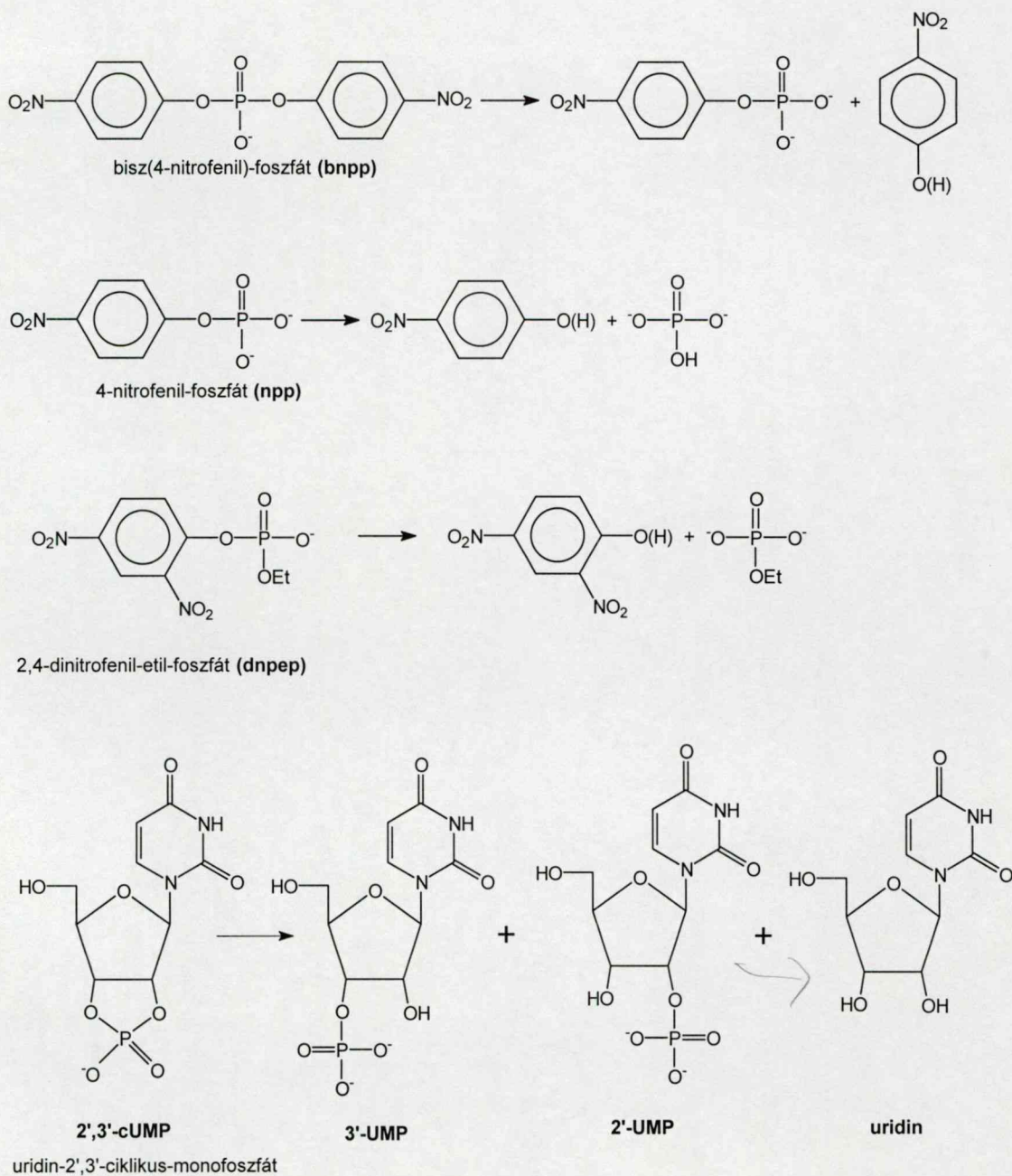
Az 1H NMR-spektrumokat szobahőmérsékleten vettük fel Bruker AM-400 spektrométeren. A 2% D_2O -t és 98 % H_2O -t tartalmazó oldatokban az izotópeffektus következtében fellépő pH-változást nem korigáltuk. A kémiai eltolódásokat dss-re (4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonát nátrium sója) vonatkoztatva adtuk meg, belső referensként 1,4-dioxánt használtunk (3,7 ppm a dss-től).

Az ionerősséget a spektroszkópiás és a kinetikai mérések során is 0,1 M-ra állítottuk be (az adott rendszertől függően $NaClO_4$ -tal, $NaCl$ -dal illetve KNO_3 -tal).

3.2.3. Kinetikai mérések

A modellvizsgálatokban alkalmazott aktivált szubsztrátok segítségével a biológiai foszfátok mindhárom alaptípusa (biológiai monofoszfátészterek, DNS, RNS) modellezhető. Mi ezek közül a 4-nitrofenil-foszfáttal (npp), a bisz(4-nitrofenil)-foszfáttal (bnpp) illetve a 2,4-dinitrofenil-etil-foszfáttal (dnpep) végeztünk kinetikai vizsgálatokat (9. ábra). Az npp-t a biológiai monofoszfátészterek, a bnpp-t és a dnpep-t a DNS modellezésére használják. A

natív foszfátészterekhez hasonlóan a modellszubsztrátok hidrolízise is eltérő feltételeket támaszt a fémkomplexek szerkezetét és ebből kifolyólag kinetikai sajátosságait illetően. Míg az aktivált foszfátészterek hidrolízise egyszerűen követhető spektrofotometriásan, addig a nemaktivált foszfátészterek vizsgálata nehezebb (csak HPLC-vel lehet követni a reakciót) és a reakció sebessége általában jóval kisebb, mint az aktivált foszfátészterek esetén. A biológiai foszfátok nemaktivált modelljeiként leggyakrabban ciklikus mononukleotidokat illetve dinukleotidokat [DNS: TpT, RNS: UpU illetve 2',3'-ciklikus-uridin-monofoszfát, 9. ábra] használnak.



9. ábra A foszfoészterek modellezésénél alkalmazott aktivált és nemaktivált foszfátészterek valamint hidrolízisük folyamata

Az általunk alkalmazott aktivált foszfátészterek hidrolízisét ($T = 298\text{ K}$ illetve 323 K) spektrofotometriásan követtük a hidrolízis során képződő 400 nm -es abszorpciós maximummal rendelkező para-nitrofenolát illetve 2,4-dinitrofenolát anion detektálása révén ($\epsilon = 18900\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A deprotonált termék rendkívül intenzív sávja lehetőséget ad a sebességi együtthatók kezdeti sebességből történő kiszámítására. A hidrolízist kb. 2-5 %-os konverzióig követve, az idő függvényében mért abszorbancia értékekből a Lambert-Beer törvény ($A = \epsilon \times c \times l$) alapján kiszámíthatjuk az egyes időpillanatokhoz tartozó para-nitrofenolát koncentrációját, vagyis az egységnyi idő alatt képződő termék mennyiségét. A sebességi együtthatók pH-tól, fém–ligandum aránytól illetve komplex-koncentrációtól való függését a kezdeti sebességek módszerével határoztuk meg, s minden esetben figyelembe vettük a pH hatását a p-nitrofenolát koncentrációjára, hiszen a hidrolízis során képződő p-nitrofenol ($pK = 6,98$) a vizsgált pH-tartományban deprotonálódik (a 2,4-dinitrofenol pK -ja $4,02$).

A komplex részvételével lejártszódó reakció az alábbi egyszerűsített egyenlettel írható le,



ahol K a komplexet, S a szubsztrátot és P a terméket jelöli. A reakció sebessége:

$$v_r = k_2 \times [K] \times [S] \quad (4)$$

vagyis a folyamat a k_2 másodrendű sebességi együtthatóval jellemezhető. Mivel a vizsgált rendszerekben a reakció ideje alatt a komplex koncentrációja állandónak tekinthető (a hidrolízis katalitikus jellegére vonatkozóan független vizsgálatokat végeztünk), ezért a folyamat pszeudo elsőrendű reakcióként kezelhető,

$$v_r = k_{\text{obs}} \times [S] \quad (5)$$

↓
log ar?

ahol k_{obs} a pszeudo elsőrendű sebességi együttható. A szubsztrát koncentrációjára a következő integrált sebességi egyenlet írható fel:

$$[S] = [S]_0 \times e^{-k_{\text{obs}} t} \quad (6)$$

amelyben $[S]_0$ a szubsztrát kiindulási koncentrációja, t pedig az eltelt idő. A keletkező termék koncentrációjának időbeli változása az alábbi egyenlettel adható meg:

$$[P]_t = [S]_0 - [S] = [S]_0 \times (1 - e^{-k_{\text{obs}} t}) \quad (7)$$

A kapott összefüggést a Lambert-Beer törvénybe helyettesítve, valamint a zárójeles kifejezést a Taylor polinom első két tagjával egyszerűsítve a pszeudo sebességi együttható a következő egyenlettel számolható a szubsztrát kb. 2-5 %-os konverzióáig:

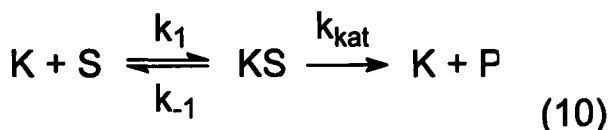
$$k_{\text{obs}} = (A - A_0)/\varepsilon \times l \times [S]_0 \times t \quad (8)$$

ahol A_0 a 0 időpillanatban mért abszorbancia, vagyis az alapvonal.

A másodrendű sebességi együttható meghatározásához a pszeudo elsőrendű sebességi együtthatók komplexkoncentrációtól való függését is tanulmányoztuk. Ahol a gyors reakció erre lehetőséget adott, ott nem csak a reakció kezdeti szakaszát vizsgáltuk, hanem a teljes kinetikai görbét is felvettük, vagyis kb. 90-95 %-os konverzióig követtük a reakciót. Ebben az esetben a következő egyenlet alapján számoltuk ki a sebességi együtthatót:

$$\ln([S]/[S]_0) = -k_{\text{obs}} \times t \quad (9)$$

A vizsgált modellrendszerek általában jól leírhatók az enzimreakciók esetén általános Michaelis-Menten-féle kinetikával, azaz a folyamat során kinetikailag stabilis átmeneti komplex alakul ki:



A k_1 és a k_{-1} az előegyensúly oda- és visszairányú reakciójának sebességi együtthatója, a k_{kat} pedig a katalitikus sebességi állandó. A folyamatot jellemző további paraméterek:

$$K_{\text{assz}} = k_1/k_{-1} \quad (11) \quad K_M = (k_{-1} + k_{\text{kat}})/k_1 \quad (12) \quad k_{\text{kat}} \times K_{\text{assz}} = k_2 \quad (13)$$

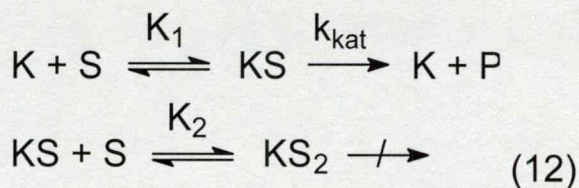
melyekben K_{assz} az asszociációs állandó, K_M a Michaelis-Menten konstans és k_2 pedig a másodrendű sebességi együttható. A modellreakciókban k_{kat} rendszerint kis érték ($k_{\text{kat}} \ll k_{-1}$), így K_M egyszerűsítve K_{assz} reciproka ($K_{\text{assz}} \cong 1/K_M$), amely ezen feltételek teljesülése mellett az átmeneti termék stabilitását jellemzi. A telítési kinetikai vizsgálatokból ezen paraméterek meghatározhatók, emellett ezzel a módszerrel is kiszámítható a k_2 másodrendű sebességi együttható értéke. A telítési görbe hagyományos módszerrel történő felvétele során a kezdeti sebesség szubsztrátkoncentrációtól való függését vizsgáltuk,

$$v_k = k_{\text{kat}} \times K_M \times [K] \times [S] / (1 + K_M [K]) \quad (11)$$

illetve részben oldékonysági problémák miatt fordított módszert is alkalmaztunk, vagyis a kezdeti sebességnek a hidrolitikusan aktív komplex koncentrációjától való függését is tanulmányoztuk.

A réz(II)-tmci rendszerben lejátszódó szubsztráthinibíció folyamata (4.5.2. fejezet) az alábbi mechanizmus segítségével írható le. Az első egyenlet megfelel az általános Michaelis-Menten kinetikának, a második lépésben pedig a szubsztrát gátló hatása érvényesül, amely az

inaktív KS₂ adduktum képződésével értelmezhető.



A kezdeti sebesség ebben az esetben az alábbi egyenlettel számolható:

$$v_{\text{ki}} = k_{\text{kat}} \times [K] / (1 + K_1/[S] + [S]/K_2) \quad (13)$$

A dolgozatban szereplő mérési pontok 3-4 párhuzamos mérés átlagát jelentik (a párhuzamos mérések közötti eltérés kb. 5-10 %).

Nemaktivált foszfátészterrel, nevezetesen a 2',3'-cUMP-vel is végeztünk kinetikai vizsgálatokat ($T = 363 \text{ K}$), ebben az esetben nagynyomású folyadékkromatográfiával követtük a hidrolízis folyamatát. A méréseket M-600 gradiens pumpával, M-996 diódasoros detektoron ($\lambda = 260 \text{ nm}$), Millenium 2010 Chromatography Manager kiértékelő rendszerrel (Millipore, Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA) végeztük. A kromatográfiás oszlop Lichrospher 100 RP-18 (150x4 mm) 5 μm szemcseátmérőjű oszlop volt (Merck). Mozgófázisként 4,3-as pH-jú 0,025 mol/dm⁻³ koncentrációjú acetát puffert használtunk, amely NH₄Cl-ra nézve 0,1 M-os volt (az áramlási sebesség: 0,4 cm³/perc).

A pH beállítását 298 K-en végeztük el, majd ezeket az értékeket 363 K-re extrapoláltuk az alkalmazott biológiai pufferek pK-jának ismeretében (pK_{mes} = 6,1, pK_{hepes} = 7,5 és pK_{ches} = 9,3 ha $T = 298 \text{ K}$). A hepes pK-ja ismert 363 K-en (pK = 6,6), a mes és a ches pufferek pK-it pedig meghatároztuk (pK_{mes} = 5,4 ± 0,05 illetve pK_{ches} = 7,8 ± 0,05, $T = 363 \text{ K}$). A dolgozatban szereplő mérési pontok mindegyikét 10 különböző időpillanatban vett minta segítségével számoltuk és természetesen egy pontra legalább egy párhuzamos mérést is végeztünk. Az egyes mintákat a kivétel után azonnal jeges vízbe helyeztük, ezáltal a reakciót befagyasztottuk. Egy méréssorozat során a különböző időpillanatokban meghatározott szubsztrátkoncentráció és a mintavétel időpontjának ismeretében a 9. egyenlet segítségével ($[S_0] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$) határoztuk meg a pszeudo elsőrendű sebességi együtthatót (a mérési pontokra a legkisebb négyzetek módszerével illesztettünk). A hidrolízis folyamatát a 9. ábra szemlélteti.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Kétfogúként koordinálódó imidazolszármazékok Cu(II)-, Zn(II)- és Ni(II)komplexei

A vizsgált ligandumok pH-metriásan meghatározott protonálódási állandóiból számolt pK értékeit valamint fémkomplexeik képződési állandóit az 1. táblázat tartalmazza. A ligandumok változatos szerkezetének köszönhetően a különböző környezetben lévő imidazolgyűrűk igen eltérő bázicitással rendelkeznek. A 4-amino-imidazol-karboxamid elsőként deprotonálódó csoportjának meglepően alacsony pK-ja – amelyet az alkalmazott körülmények mellett nem tudtunk meghatározni – az imidazolgyűrűhöz vagy a aminonitrogénhez rendelhető. Bár az imidazolgyűrű bázicitására az amino- és az imidazolcsoport szeparációjának csökkenése nagyobb hatást gyakorol, mint ahogy az a hisztamin ($pK_{am} = 9,74$ és $pK_{im} = 6,07$ [37]) és a 4(5)-aminometil-imidazol ($pK_{am} = 9,35$ és $pK_{im} = 4,73$ [83]) pK-inak összehasonlításából látható, egyértelmű hozzárendelés a mért alacsony pK-k miatt nem tehető. A 2,2'-bisz-imidazol elsőként deprotonálódó imidazolcsoportjának szintén igen alacsony pK-ja egyrészt a közvetlenül kapcsolódó imidazolgyűrűk közötti elektronszívó kölcsönhatással, másrészt a köztük létrejövő erős hidrogénhidas szerkezettel magyarázható. A két deprotonálódás közti különbség ($\Delta pK > 3,5$) az analóg bisz(imidazol-2-il)-metánnál ($pK_{im,1} = 4,74$ és $pK_{im,2} = 6,93$, $\Delta pK = 2,19$ [40]) erősebb hidrogénhíd kialakulására utal. A biimnél ugyanis kisebb tagszámú H-híd alakulhat ki, mint a bisz(imidazol-2-il)-metán esetén, ahol az imidazolgyűrűk egy szénatomon keresztül kapcsolódnak egymáshoz. A 4-imidazol-ecetsav imidazolcsoportja a karboxilát és az imidazol 3-as nitrogénje közötti hidrogénhidas kölcsönhatás következtében magasabb pH-n deprotonálódik, mint az imidazol-4-acetamid molekulában ($pK_{im} = 6,41$) [84].

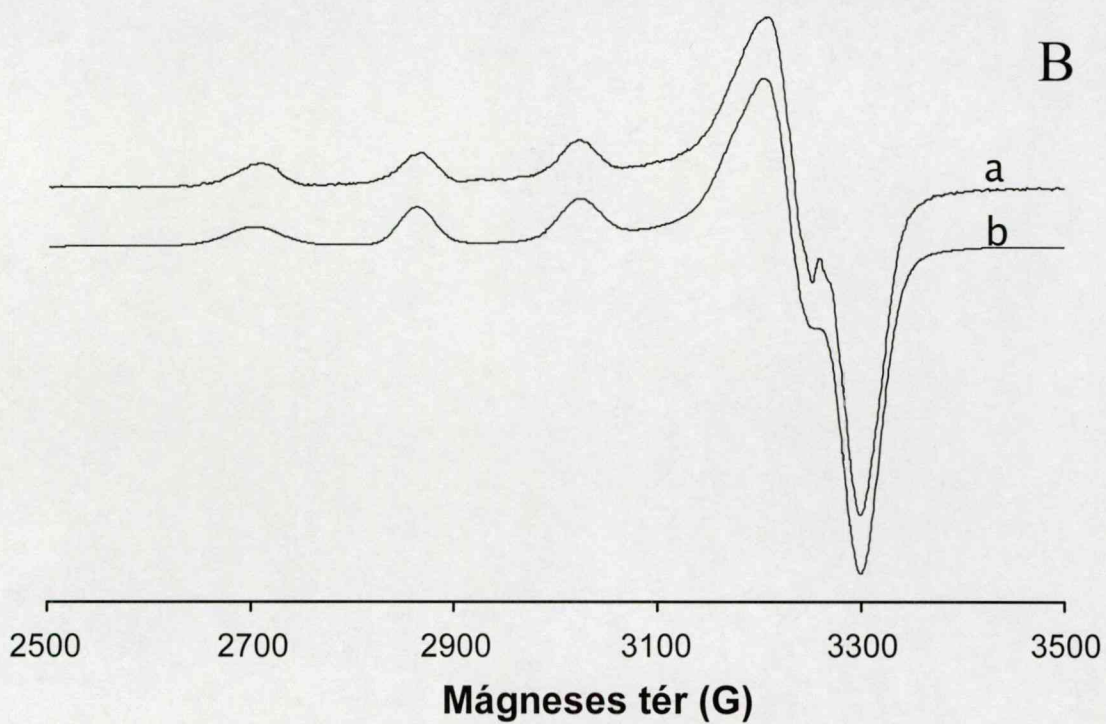
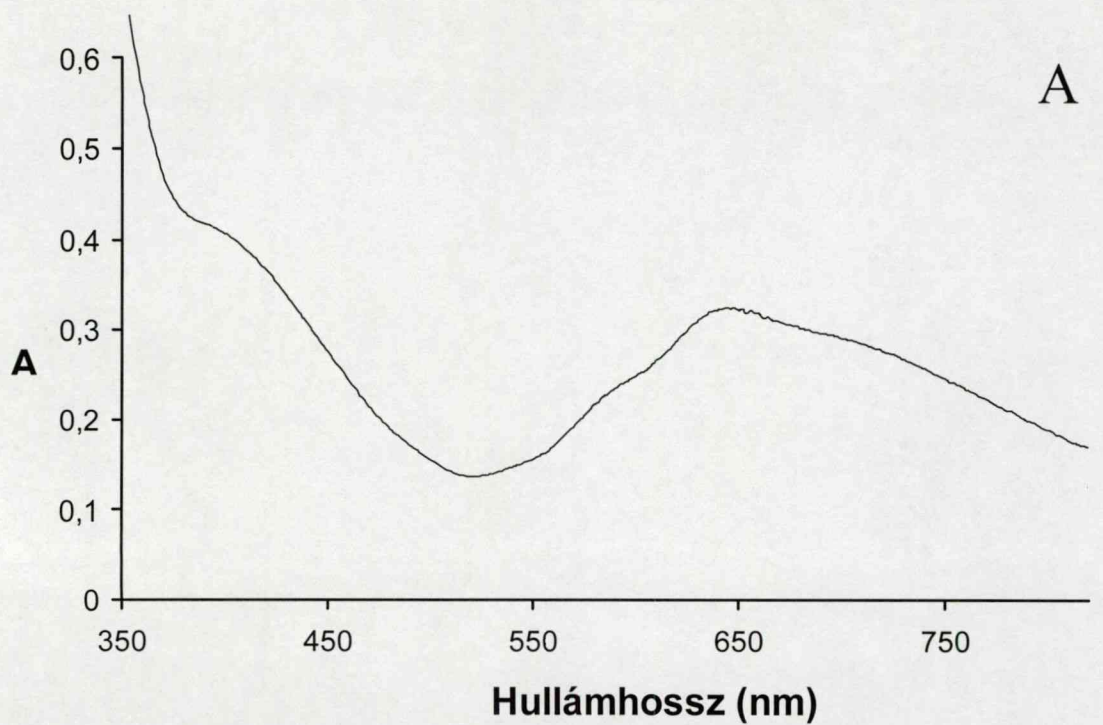
A 4-amino-imidazol-karboxamid esetén kialakuló fémkomplexek képződési állandóinak meghatározása során pH = 6-ig értékeltük a titrálási görbéket, mivel magasabb pH-n csapadékképződést tapasztaltunk. Az általunk alkalmazott kísérleti körülmények mellett mindhárom fémionnal egyszerű ML és ML₂ összetételű komplexek alakulnak ki. A ligandum három lehetséges donorcsoportot tartalmaz (O_{karbonil}, NH₂, N_{im}), azonban az amino- és az imidazolnitrogén szterikus okok miatt nem tud kialakítani kelátgyűrűt a fémionnal. Ezek alapján a bázikusabb nitrogén és a karboniloxigén koordinációját feltételezzük a kialakuló mono- és biszkomplexekben. A réz(II)-aic rendszerben 5,5-ös pH-n és 1:4 fém–ligandum aránynál (ilyen körülmények mellett ML és ML₂ komplexek egyaránt jelen vannak) az UV-látható spektrumon 680 nm-nél széles d-d átmeneti- valamint 400 nm-nél intenzív

töltésátviteli sáv figyelhető meg. Ugyanezen a pH-n jelentős ligandumfelesleget alkalmazva ($[Cu]/[L] < 1/40$) 590 nm-nél fokozatosan egy új d-d átmeneti sáv jelenik meg a ligandumfelesleg növekedésével, ami a nagyobb ligandumtérerejű 4N-es ML_4 összetételű komplex képződésének tulajdonítható. Mivel az ML_2 komplex még ötszörös ligandumfelesleg mellett is csak kb. 50-60 százalékban van jelen vizes oldatban, ezért a spektroszkópiás vizsgálatokat metanolban végeztük el. Az ML_2 komplex UV-látható spektrumán (12.A ábra) a d-d tartományban részben felhasadó sávszerkezet illetve 400 nm-nél intenzív töltésátviteli sáv figyelhető meg. A d-d átmenet 644 nm-es maximummal rendelkezik, ami két nitrogén ekvatoriális síkban történő koordinálódásának felel meg. A spektrofotometriás mérések mellett az ESR-paraméterek ($g_{\perp} = 2,075$, $g_{\parallel} = 2,291$, $A_{\perp} = 14$ G, $A_{\parallel} = 156$ G) szintén $\{2N,2O\}$ koordinációjú, torzult oktaéderes (vagy négyzetes piramisos) szerkezetű ML_2 komplex kialakulását valószínűsítik. A 77K-en felvett spektrum (a) illetve az illesztett spektrum (b) a 12.B ábrán látható.

A 2,2'-bisz-imidazol mindhárom fémionnal szintén egyszerű ML és ML_2 összetételű mono- és biszkomplexeke képez. Ebben az esetben is pH = 6-ig értékeltük a titrálási görbéket, mivel magasabb pH-n csapadékképződést tapasztaltunk. Annak ellenére, hogy az imidazolnitrogének kis bázicitásúak, a kétfogú ligandum igen stabil fémkötőhelynek bizonyult a kialakuló öttagú kelátgyűrűnek illetve az imidazolgyűrűk erős π -akceptor sajátságainak köszönhetően. A bázicitással korrigált képződési állandók alapján érdekes összehasonlítás tehető a 2,2'-bipiridinnel illetve a bisz(imidazol-2-il)-metánnal. A három ligandum közül a 2,2'-bipiridin réz(II)komplexei a legstabilabbak, amelynél $\log K_{1,korr} = \log \beta_{110} - \log \beta_{012} = 4,81$, $\log K_{2,korr} = 1,52$ [85]. Az általunk vizsgált 2,2'-bisz-imidazol réz(II)komplexei több logaritmus egységgel nagyobb stabilitással bírnak ($\log K_{1,korr} \sim 0,70$, $\log K_{2,korr} \sim -0,90$, ahol $\log \beta_{012} \approx 5.58$, $pK_1 \approx 0,4$ [86]), mint az analóg bisz(imidazol-2-il)-metán ($\log K_{1,korr} = -2,03$, $\log K_{2,korr} = -4,28$ [40]), ami a kelátgyűrűk tagszámának változásával magyarázható. A $\log(K_1/K_2)$ értékek alapján az általunk vizsgált rendszerben kedvezményezett a második ligandum beépülése az oktaéderes szimmetria következtében a cink(II)- és nikkel(II)tartalmú (0,88 és 0,43) rendszerekben, összehasonlítva a réz(II)-el (1,58). Azonban ezen utóbbi érték még mindig alacsonyabb, mint az analóg 2,2'-bipiridin (3,29) illetve a bisz(imidazol-2-il)-metán (2,25) esetén, ami egyrészt az általunk vizsgált ligandum kisebb térkitöltésével, másrészt pedig a kialakuló kelátgyűrű alacsonyabb tagszámával magyarázható. Mivel a 2,2'-bisz-imidazol oldhatósága nagyon kicsi vízben, ezért komplexei esetén spektroszkópiás vizsgálatokat nem végeztünk.

1. táblázat *A kétfogúként koordinálódó imidazoltartalmú ligandumok pK értékei és Cu(II)-, Zn(II)- illetve Ni(II)ionokkal alkotott komplexeik képződési állandói (logβ) (T = 298 K, I = 0,1 M NaClO₄, a becsült hibaértékek zárójelben)*

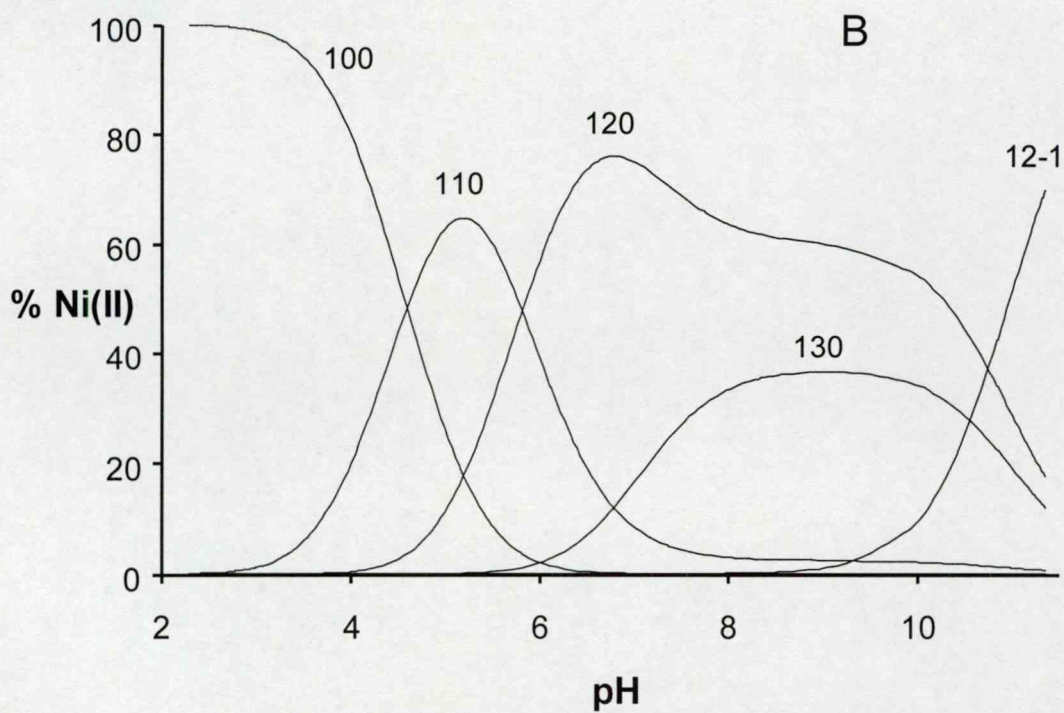
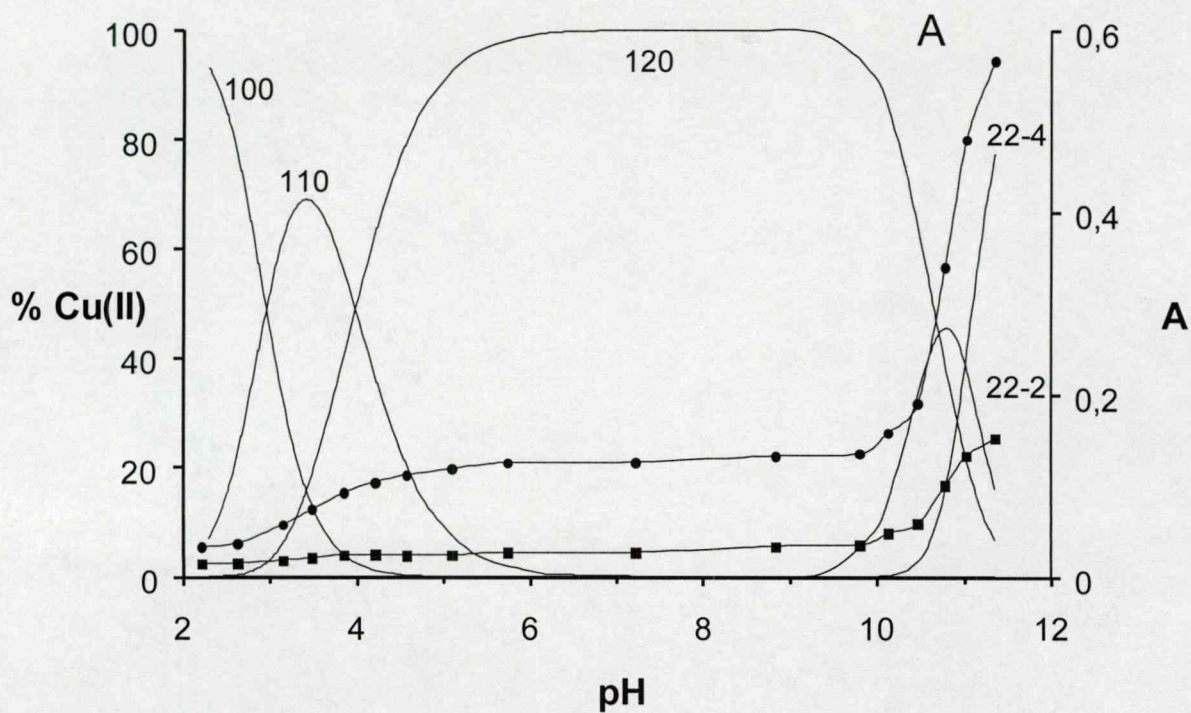
	aic	biim	iaa
pK ₁	< 1	< 1	3,188(2)
pK ₂	4,018(2)	5,185(3)	7,336(1)
CuL	3,54(1)	6,27(4)	6,86(3)
CuL ₂	5,76(2)	10,96(5)	12,43(3)
Cu ₂ L ₂ H ₂	---	---	1,90(6)
Cu ₂ L ₂ H ₄	---	---	-20,11(8)
Illesztési paraméter	0,002 cm ³	0,002 cm ³	0,005 cm ³
Kísérleti pontok száma	340	315	420
ZnL	1,77(4)	3,48(3)	3,81(2)
ZnL ₂	---	6,54(3)	7,15(3)
ZnL ₃	---	---	9,48(3)
Illesztési paraméter	0,003 cm ³	0,003 cm ³	0,003 cm ³
Kísérleti pontok száma	280	325	265
NiL	2,45(1)	4,87(3)	4,81(1)
NiL ₂	4,16(2)	8,86(5)	8,49(5)
NiL ₃	---	---	10,56(6)
NiL ₂ H ₁	---	---	-2,26(4)
Illesztési paraméter	0,003 cm ³	0,002 cm ³	0,005 cm ³
Kísérleti pontok száma	325	300	370



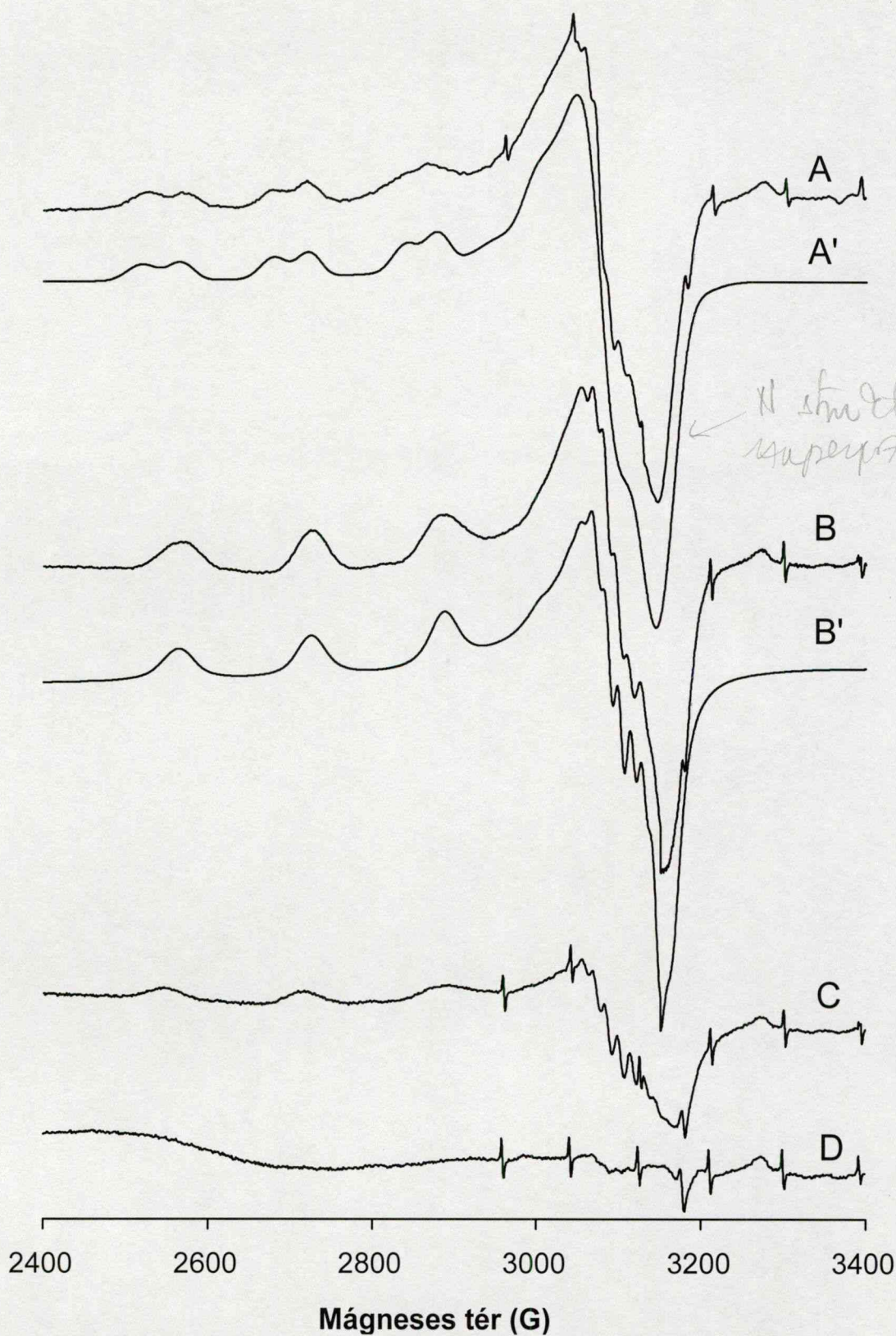
12. ábra A Cu(aic)_2 komplex UV-látható (A) ($T = 298 \text{ K}$) és fagyasztott (a mért és b számolt) ESR-spektruma (B) metanolban ($T = 77 \text{ K}$)

$$[\text{Cu(II)}] = 0,2 \times [\text{L}] = 0,0065 \text{ M}$$

A 4-imidazol-ecetsav esetén bármely cink(II)-ligandum arányánál pH 9 fölött csapadékképződést tapasztaltunk, míg a réz(II)- és a nikkel(II)tartalmú rendszerekben csak az ekvimoláris összetételnél. A vizsgált ligandum pH = 7-ig mindhárom fémionnal ML illetve ML₂ összetételű törzskompleket képez (13. ábra). A réz(II)-iaa rendszerben összhangban a részecskeeloszlással a 4,5-es pH-n detektált ESR-spektrum két egymagvú részecske egyidejű jelenlétére utal (14.A ábra), 7-es pH-n pedig már csak egyetlen részecske van jelen (14.B ábra). A potenciometriás mérések alapján a kizárólag pH = 4,5-nél jelentkező jel az ML komplexnek tulajdonítható ($g_{\perp} = 2,067$, $g_{\parallel} = 2,308$, $A_{\perp} = 16$ G, $A_{\parallel} = 157$ G), míg a pH = 7-nél domináns részecske, amely már pH = 4,5-nél is megjelenik az ML komplex mellett, ML₂ összetételű ($g_{\perp} = 2,060$, $g_{\parallel} = 2,274$, $A_{\perp} = 16$ G, $A_{\parallel} = 160$ G, $A_{N,\perp} = 14$ G). Az ML₂ komplex UV-látható spektrumán a d-d átmenet maximuma 640 nm-nél van, 350 nm-nél pedig intenzív töltésátviteli sáv figyelhető meg. Az ESR-paraméterek, valamint a spektroszkópiás mérések alapján ezekben a komplexekben az imidazol- és a karboxilcsoport koordinálódik és a β -alanin komplexekhez hasonlóan hattagú kelátgyűrű alakul ki. A bázicitással korrigált képződési állandók ($\log K_{I,korr} = -3,67$ és $-5,73$ a réz(II)- illetve a nikkel(II)komplexek esetén) azonban három nagyságrenddel nagyobbak, mint a β -alanin esetén ($\log K_{I,korr} = -6,71$ [87] a réz(II)- illetve $-9,15$ [88] a nikkel(II)tartalmú rendszerekben). Ez a lényeges különbség az imidazolgyűrű és a fémionok között kialakuló π -kölcsonhatással magyarázható, ami nem jöhet létre a β -alanin komplexekben. A réz(II)- és a nikkel(II)tartalmú rendszerekben pH 7 fölött további lúgfogyasztó folyamatok játszódnak le, ami a nikkel(II) esetében valószínűleg ML₂H₁ összetételű vegyes hidroxokomplex kialakulásához vezet. A réz(II)tartalmú rendszerekben azonban az ESR-jel intenzitása pH 10-től 11,5-ig fokozatosan csökken (14.C és D ábra) valószínűleg olyan oligomer komplexek képződése következtében, ahol erős antiferromágneses kölcsönhatás jön létre a fémcentrumok között. A potenciometriás mérések alapján pH 10 fölött M₂L₂H₂ illetve M₂L₂H₄ összetételű részecskék vagy oligomerjeik $\{(CuLH_1)_n$ és $(CuLH_2)_n, n \geq 4$ [33,35]} képződnek, amely egyrészt dihidroxo-hidas dimerek kialakulásához vagy pedig az imidazolgyűrű pirrolos nitrogénjének deprotonálódásához rendelhető. Mivel mindkét folyamatot 350 nm közelében töltésátviteli sáv kialakulása kíséri [33,34,89], a kettő nem választható el, de a szukcesszív folyamatok miatt valószínűleg mindkettő lejátszódik. Bár a hisztamin szintén a kétfogúként koordinálódó ligandumok családjába tartozik, a kapott eredményeket a hasonló alegységeket tartalmazó dhen ligandummal a 4.4. fejezetben tárgyaljuk.



13. ábra A réz(II)–iaa(A) és nikkel(II)–iaa(B) rendszerek eloszlásgörbéi; A szaggatott vonalak a fényelnyelés 350 nm (●) illetve 400 nm-nél (■) tapasztalható pH függését mutatják
($T = 298\text{ K}$, $I = 0,1\text{ M NaClO}_4$, $[M(II)] = 0,2 \times [L] = 0,002\text{ M}$)



14. ábra A réz(II)–iaa rendszer fagyasztott ESR-spektrumainak pH-függése
 ($T = 77\text{ K}$, $[\text{Cu(II)}] = 0,2 \times [\text{L}] = 0,002\text{ M}$, $\text{pH} = 4,5$ (A és A'), $5,8$ (B és B'),
 $10,8$ (C) és $11,5$ (D) ; A' és B' illesztett spektrumok

4.2. Többfogú, nem lineáris szerkezetű imidazolszármazékok réz(II)- és cink(II)komplexei

A két hasonló szerkezetű tripodális ligandum pH-metriásan meghatározott protonálódási állandóiból számolt pK értékeit valamint fémkomplexeik képződési állandóit a 2. táblázat tartalmazza. A biib négy protonálható csoportot tartalmaz (három imidazol- és egy iminocsoport), a szekunder aminocsoport nagyobb bázicitásának köszönhetően elsőként nagy valószínűséggel az imidazolgyűrűk deprotonálódnak. Az elsőként deprotonálódó imidazolcsoport (ami feltételezhetően a bisz-imidazol egység egyik gyűrűje) meglepően alacsony pK-ja két okra vezethető vissza: (1) a ligandum teljesen protonált formájában négy pozitív töltésű, így deprotonálódása kedvezményezett; (2) másrészt az első deprotonálódás során a két egymáshoz közeli imidazolgyűrű között erős hidrogénhidas szerkezet (hattagú kelátgyűrű) alakulhat ki, ami ugyancsak elősegíti az első proton disszociációját. A szekunder aminocsoport szintén a vártnál alacsonyabb pH-n deprotonálódik, amely a közeli imidazolcsoportok elektronszívó hatásának tulajdonítható. A bimha, hasonlóan a biib-hez, négy protonálható csoportot tartalmaz, három imidazol- és egy tercier aminocsoportot. A tercier aminocsoport nagyobb bázicitásának köszönhetően az alacsonyabb pK értékek az imidazolcsoportokhoz rendelhetők.

2. táblázat A többfogú, nem lineáris szerkezetű biib és bimha pK értékei

valamint réz(II)- illetve cink(II)ionokkal alkotott komplexeik képződési állandói

($T = 298\text{ K}$, $I = 0,1\text{ M NaClO}_4$ (biib) illetve NaCl (bimha), a becsült hibaértékek zárójelben)

	biib		bimha			
pK ₁	1,3(1)		<1		mivel kisebb a mg ²⁺ az előzőnél is	
pK ₂	3,822(2)		5,86(2)			
pK ₃	5,849(2)		6,59(2)			
pK ₄	7,133 (2)		8,61(1)			
	CuLH	17,64(1)	CuLH ₂	22,10(4)		
	Cu ₂ L ₂	31,80(1)	CuLH	20,15(1)	ZnLH	15,99(5)
	Cu ₂ L ₂ H ₁	24,49(1)	CuL	16,06(2)	ZnL	12,73(1)
	Cu ₂ LH ₁	13,07(1)	CuL ₂ H ₂	23,6(1)		
	Cu ₂ LH ₂	5,84(6)	CuL ₂ H	27,63(5)		
			CuL ₂	19,96(4)		
F. P.		0,006		0,004		0,007
N. P.		611		369		290

F. P. = illesztési paraméter (cm³), N. P. = kísérleti pontok száma

Elsőként valószínűleg a metilezett imidazolgyűrűk egyike deprotonálódik, hiszen így kisebb tagszámú H-hidas gyűrű alakulhat ki, mint a hisztamin típusú imidazolcsoport részvételével. A biib esetén valószínűleg első lépésben a bisz-imidazol egység egyik imidazolcsoportjának deprotonálódásával egy hattagú hidrogénhidas gyűrű jön létre. Mivel az imidazolgyűrű 2-es pozíciójában szubsztituált származékok általában kisebb bázicitásúak [41], ezért ebben az esetben nagy valószínűséggel a második deprotonálódás is a bisz-imidazol egységhez rendelhető. A harmadik hisztamin típusú imidazolcsoport ennek megfelelően 5,85-ös pK-val bír, ami szinte megegyezik a bimha esetén mért pK = 5,86-os értékkel.

A négyfogú biib esetén csak réz(II)tartalmú 1:1 és 2:1 fém–ligandum aránnyal rendelkező rendszereket tanulmányoztunk, mivel nem állt kellő mennyiségű ligandum a rendelkezésünkre és ezért méréseinket $[\text{Cu}_2\text{L}_2(\text{ClO}_4)_2] \times 2\text{ClO}_4$ összetételű egykristály segítségével tudtuk csak elvégezni. A képződő réz(II)komplexek képződési állandóit a 2. táblázat tartalmazza, a részecskeeloszlási görbék a 16. ábrán láthatók. Ekvimoláris összetételnél két fő részecske alakul ki, a pH = 2-es maximummal rendelkező CuLH és a pH = 4-6 között 100 %-os mennyiségben jelenlévő fémet és ligandumot 1:1 arányban tartalmazó (CuL vagy Cu₂L₂ összetételű) komplex. Magasabb pH-n további deprotonálódás figyelhető meg, azonban a titrálási görbéket pH~7-ig tudtuk csak kiértékelni, mivel előlött csapadékképződést tapasztaltunk. A keletkező csapadék sötétkék színű, vagyis rosszul oldódó komplex(ek) alakul(nak) ki, nem pedig réz(II)hidroxid képződik.

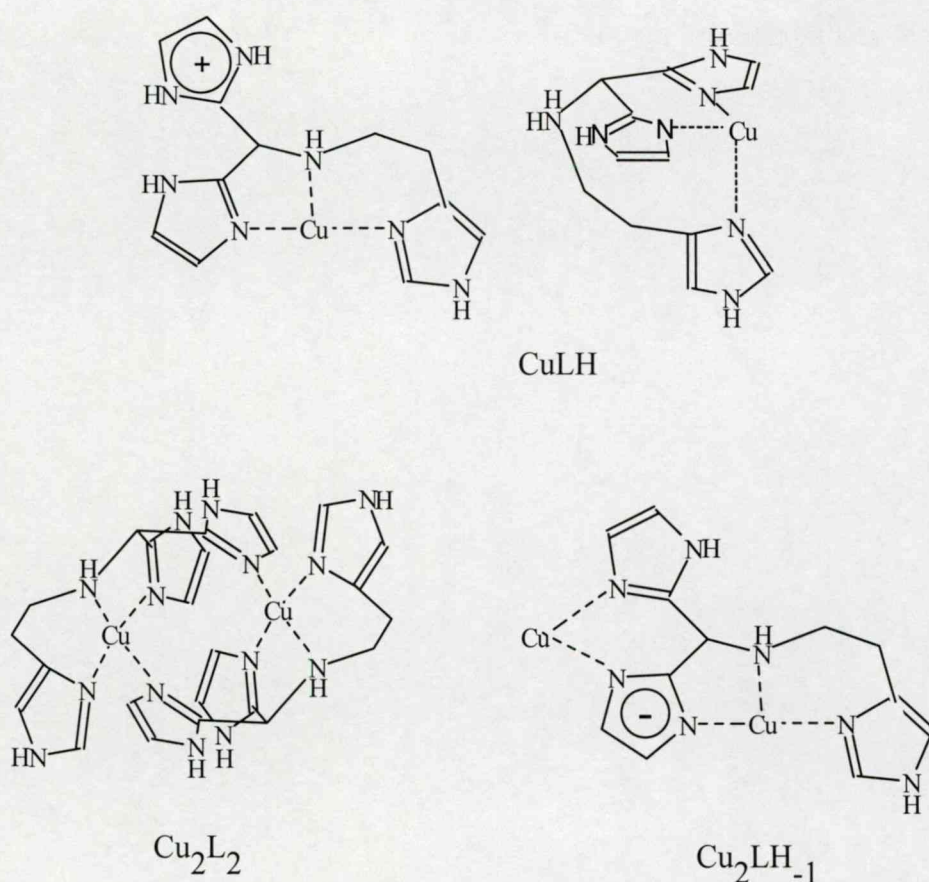
A ligandum négy donorcsoportjának köszönhetően két eltérő szerkezetű, CuLH összetételű komplex alakulhat ki: (1) a {3N_{im}} koordinációjú komplexben a bisz-imidazol egység két imidazolgyűrűje az ekvatoriális síkban, míg a harmadik imidazolgyűrű axiálisan és ezáltal egy kicsit gyengébben kapcsolódik a fémionhoz; (2) {N_{im}, NH, N_{im}} koordináció esetén pedig mindhárom donorcsoport ekvatoriális helyzetben helyezkedik el, a képződő komplex egy öt- és hattagú csatolt kelátgyűrűt tartalmaz (15. ábra). A potenciometriás mérések alapján pH = 2-nél egyetlen CuLH összetételű részecske képződik közel 100 %-ban. A pH = 2-nél felvett tipikusan egymagvú komplexre utaló fagyasztott ESR-spektrum (17.A ábra) azonban két egymás mellett létező kötési izomer jelenlétét mutatta, vagyis az előbb említett két különböző szerkezetű, de azonos összetételű komplex valószínűleg egyidejűleg van jelen ({3N_{im}} esetén g_{||} = 2,302, g_⊥ = 2,067, A_{||} = 152 G illetve {N_{im}, NH, N_{im}} koordinációnál g_{||} = 2,263, g_⊥ = 2,065, A_{||} = 169 G, A_⊥ = 32 G. Az UV-látható spektrumon

pH = 2-nél 335 nm-es intenzív töltésátviteli sáv figyelhető meg, a d-d átmenet maximuma 660 nm-nél jelentkezik.

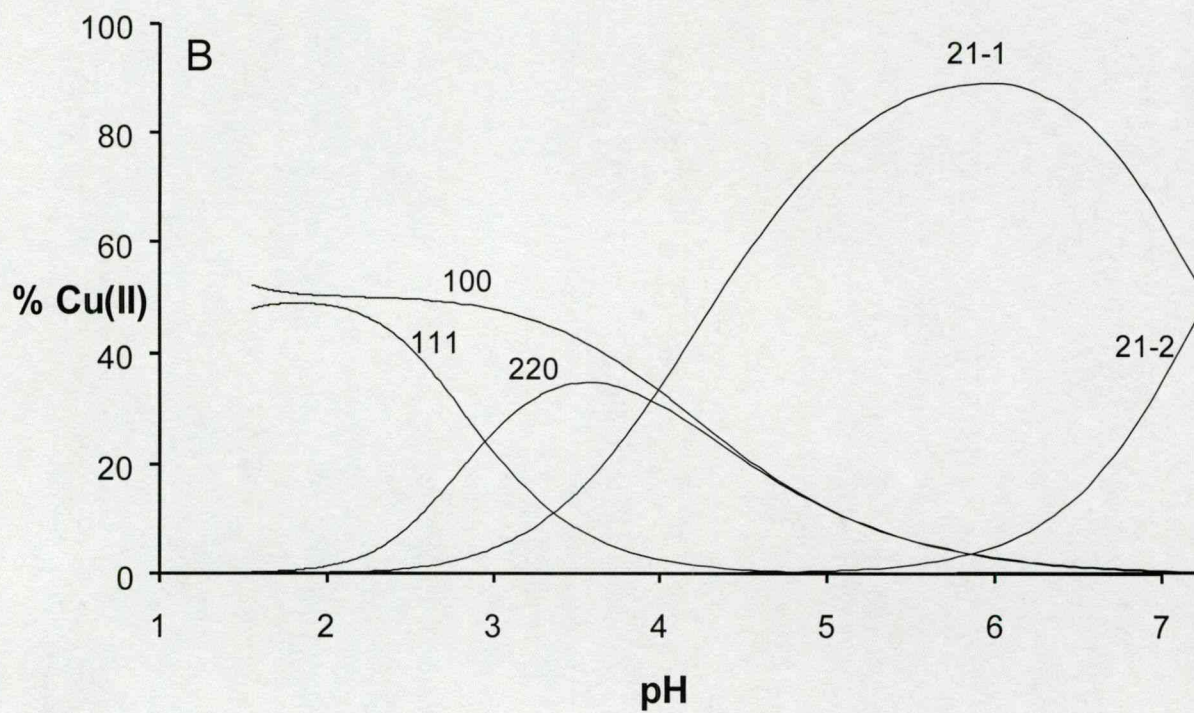
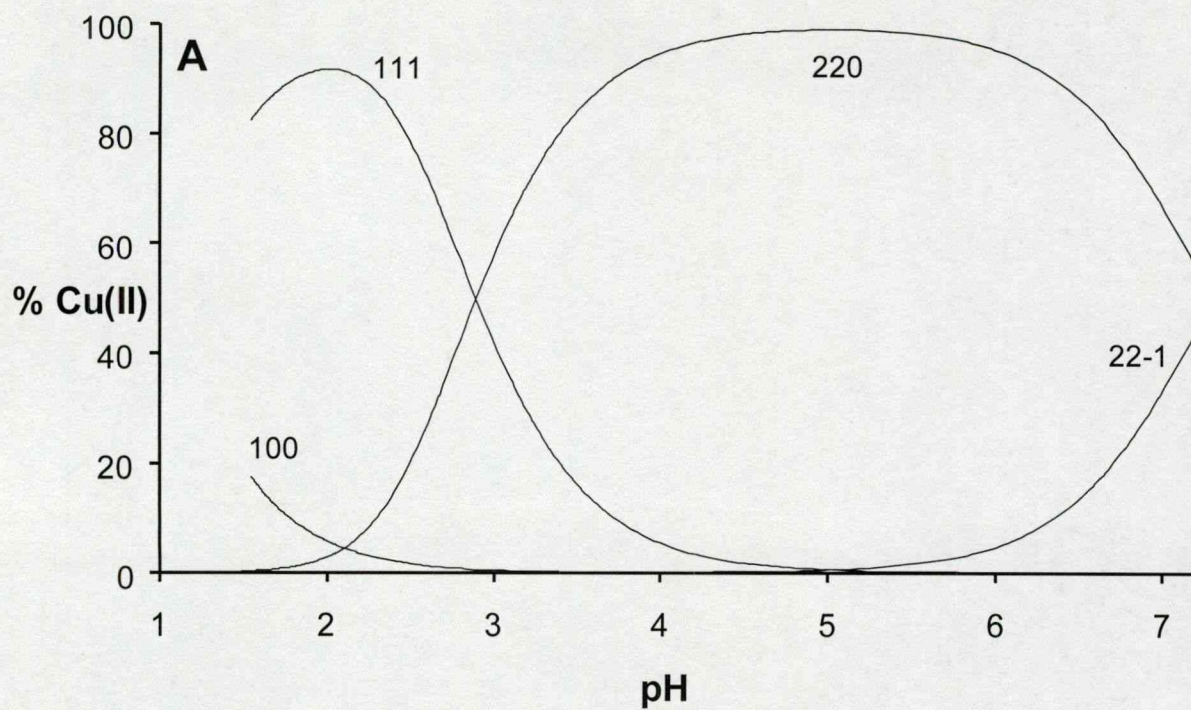
A spektroszkópiai vizsgálatok pH = 2-5 között egy új komplex kialakulását mutatják. A d-d maximum 660 nm-ről 588 nm-re tolódik el. A potenciometriás eredmények alapján (1:1 fém–ligandum arány) Cu_2L_2 összetételű komplex képződik, amely pH~5 körül 100 %-ban van jelen. A kialakuló részecske egy igen jellegzetes, nagy zérustérfelhasadással (487 G) bíró tripllett ESR-jelet ad (17.B ábra), ESR-spektrumán a párosítatlan elektron és a két réz(II)centrum közötti hiperfinom kölcsönhatás eredményeképpen létrejövő 1:2:3:4:3:2:1 intenzitásarányokkal jellemezhető felhasadási kép is látható (17.b ábra). A meghatározott ESR-paraméterek ($g_{\perp} = 2,180$, $g_{\parallel} = 2,041$, $A_{\perp} = 14$ G, $A_{\parallel} = 89$ G, $D = 487$ G) és a spektrofotometriás mérések eredményei ($\lambda_{\text{CT}} = 325$ nm illetve $\lambda_{\text{d-d}}^{\text{max}} = 588$ nm) alapján a kialakuló kétmagvú komplexben a fémionok körül az ekvatoriális síkban négy nitrogén koordinálódik. Méréseink szerint tehát a Cu_2L_2 összetételű komplex két egymással közvetlenül nem csatolódó, 4N-koordinált rezet tartalmaz, ami csak a 15. ábrán látható szerkezet esetén valósulhat meg, azaz a szimmetrikus szerkezetű kétmagvú komplexben a fémcentrumok között a bisz(imidazol-2-il) egység egy-egy imidazolgyűrűje tölti be a híd szerepét. Tehát vizes oldatban ugyanaz a komplex alakul ki, mint amit Reedijk és munkatársai egykristály formájában előállítottak [18,19].

A kétszeres fémfelesleget tartalmazó rendszerben pH 4 fölött egy kétmagvú, Cu_2LH_1 összetételű komplex válik dominánssá, majd az ekvimoláris rendszerhez hasonlóan pH 7 fölött csapadékképződés tapasztalható (ebben az esetben is sötétkék színű a csapadék). A kétmagvú komplex kialakulásával az UV-látható spektrumon a töltésátviteli átmenetre utaló 'váll' 360 nm-nél ($\epsilon = 200$) jelentkezik, a d-d átmenet maximuma pedig 656 nm-nél ($\epsilon = 40$) található. A képződő részecske fagyasztott ESR-spektruma (17.C ábra) szintén kétmagvú komplexre jellemző spektrum, azonban a zérustérfelhasadás elhanyagolható mértékű. A g_{\parallel} tartományban ebben az esetben is látható a párosítatlan elektron és a két réz(II)centrum közötti hiperfinom kölcsönhatás eredményeképpen létrejövő hét jel. Magát a spektrumot, valószínűleg a nem ekvivalens réz(II)centrumok miatt nem sikerült megilleszteni. A komplexképződés során lejátszódó "extra" deprotonálódás vagy a fémionhoz koordinált vízmolekula vagy a ligandum további deprotonálódásához rendelhető. Mivel azonban nem valószínű, hogy a ligandum a másodikként kapcsolódó réz(II)iont csak egyetlen donoratomon keresztül köti (ami akkor valósulna meg, ha az elsőként koordinálódó réz(II)ionhoz kötődő vízmolekula deprotonálna), ezért ebben az esetben is csak egyetlen szerkezet adódhat (15.

ábra). Ezek alapján a Cu_2LH_1 összetételű komplex két aszimmetrikus fémcentrumot tartalmaz – az egyik analóg a CuLH összetételű komplex esetén megvalósuló $\{\text{N}_{\text{im}}, \text{NH}, \text{N}_{\text{im}}\}$ koordinációval, míg a másik bisz-imidazolszerű koordinációnak felel meg – melyek imidazoláthídon keresztül kapcsolódnak egymáshoz. Korábbi vizsgálatok során [33-35] is találkoztak már az imidazolgyűrű pirrolos nitrogénjének réz(II)ion(ok) által elősegített deprotonálódásával (melynek eredményeképpen imidazoláthidas oligomer komplexek alakulnak ki), ahol ez a folyamat csak pH 8 fölött játszódott le. Az általunk vizsgált rendszerben pH 4 körül megtörténik a deprotonálódás, melynek eredményeképpen a második réz(II)ion is koordinálódik, ami a ligandum rendkívül nagy fémionmegkötő képességére utal.



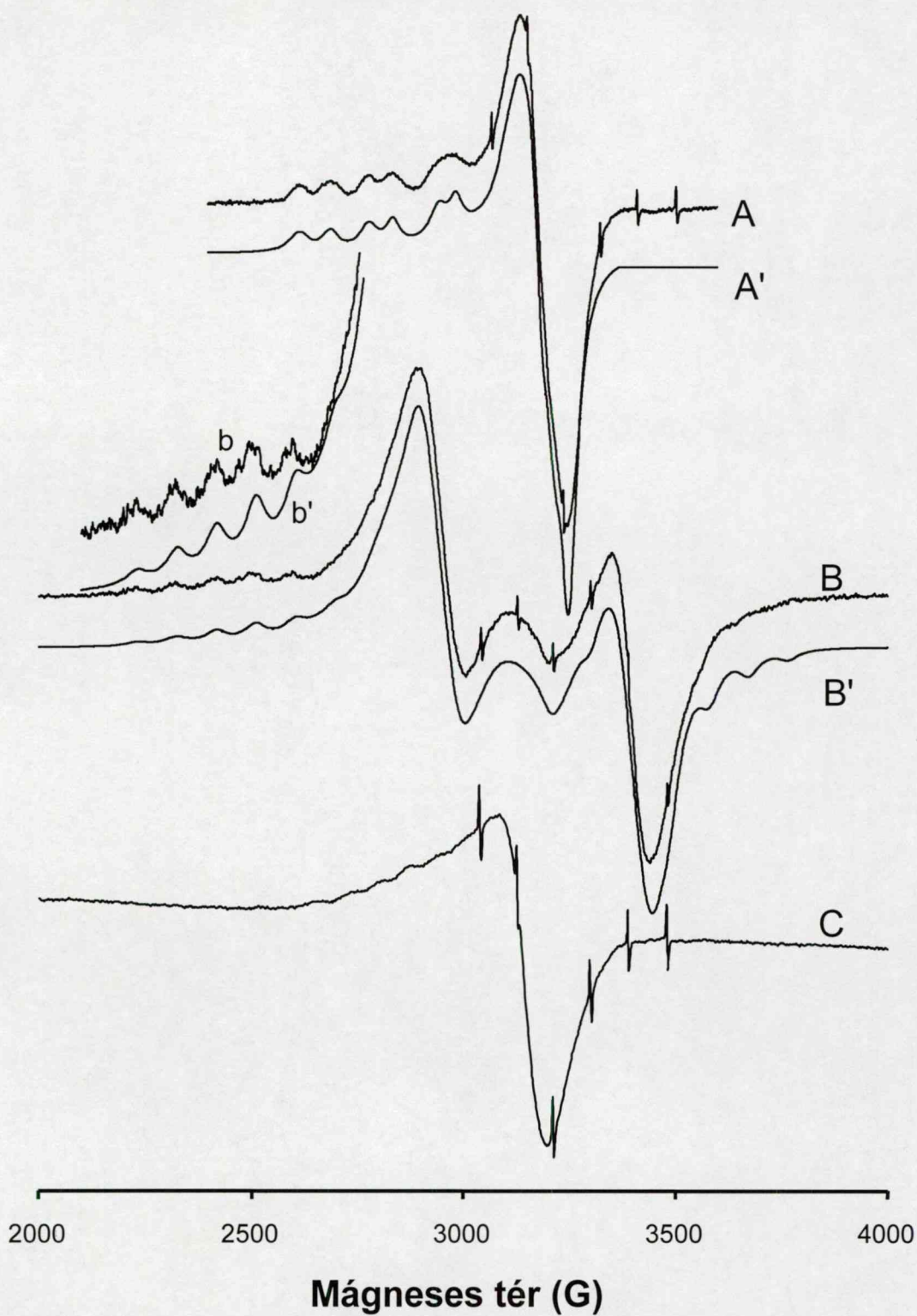
15. ábra A réz(II)–biib rendszerben képződő komplexek vázlatos szerkezete



16. ábra A réz(II)–biib rendszer eloszlásgörbéi

$[Cu(II)] = [L] = 0,005\text{ M}$ (A) illetve $[Cu(II)] = 1,9 \times [L] = 0,008\text{ M}$ (B)

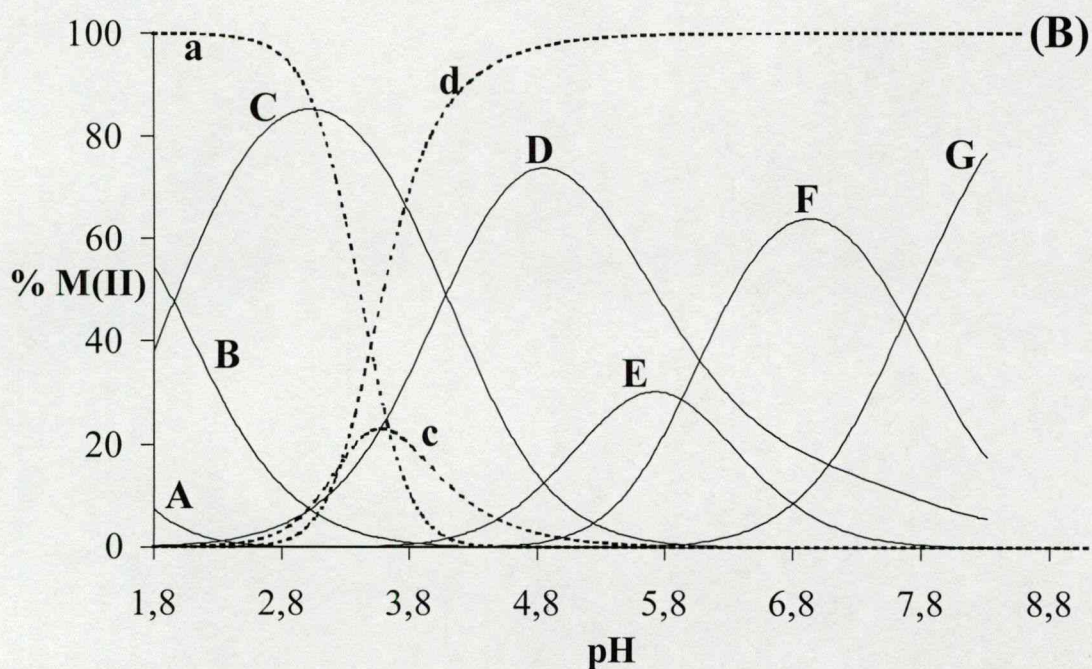
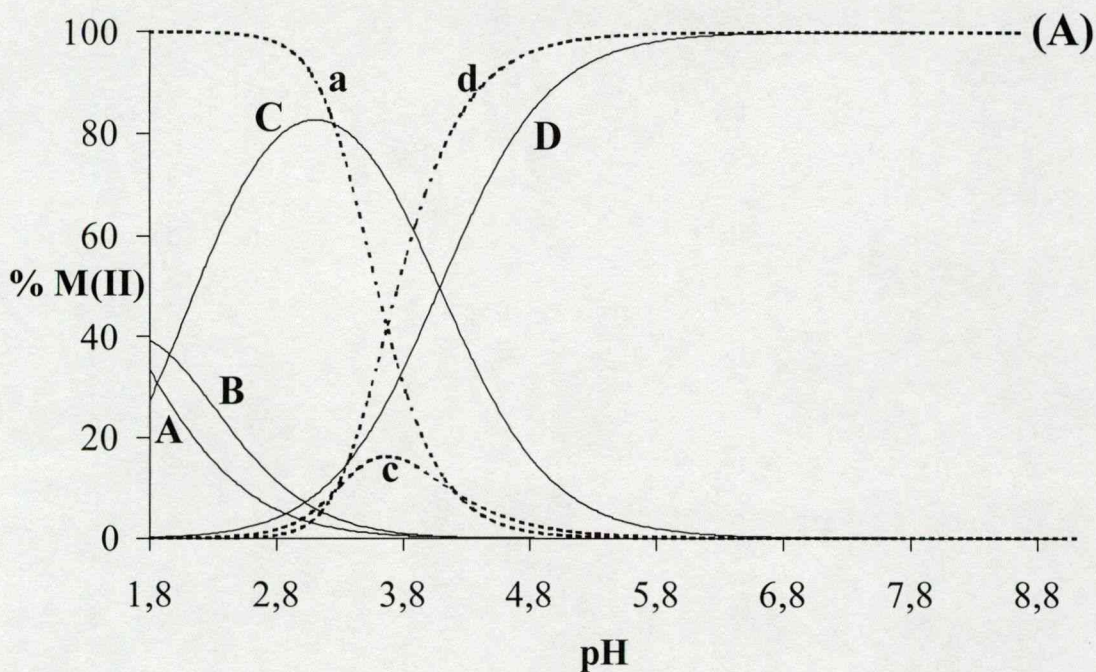
($T = 298\text{ K}$, $I = 0,1\text{ M NaClO}_4$)



17. ábra Fagyasztott ESR-spektrumok a réz(II)–biib rendszerben
 ($T = 77\text{ K}$, (A) $[\text{Cu(II)}] = [\text{L}] = 0,005\text{ M}$, $\text{pH} = 2$; (B és b) $[\text{Cu(II)}] = [\text{L}] = 0,005\text{ M}$,
 $\text{pH} = 5,5$; (C) $[\text{Cu(II)}] = 2,1 \times [\text{L}] = 0,008\text{ M}$, $\text{pH} = 5,2$;
 A', B' és b' illesztett spektrumok

A hasonló szerkezetű, négyfogú bimha esetén kialakuló réz(II)- és cink(II)komplexek képződési állandóit a 2. táblázat tartalmazza. A réz(II)tartalmú rendszert pH = 9-ig (illetve 1:1 összetételnél pH = 7,5-ig), cink(II) jelenlétében pedig pH = 8,3-ig tanulmányoztuk, mivel e fölött csapadékképződés tapasztalható. A kapott részecskeeloszlási görbék alapján (18. ábra) a réz(II)–bimha rendszerben kétszeresen protonált CuLH_2 összetételű részecske alakul ki a savas pH-tartományban. A CuLH összetételű komplex pH~3 körül válik dominánssá. A CuL komplex a $\text{CuLH} = \text{CuL} + \text{H}$ folyamatban ($\text{pK} = 4,09$) képződik. A cink(II)tartalmú rendszerekben valószínűsíthető részecskeeloszlás azonban nagymértékben különbözik a réz(II)-tól. Ebben az esetben a ZnLH csak kb. 20 %-os mennyiségben képződik, deprotonálódása majdnem egy pH- egységgel alacsonyabb pK-n ($\text{pK} = 3,26$) játszódik le összehasonlítva a CuLH komplexszel ($\text{pK} = 4,09$). A kapott eredmények arra utalnak, hogy a réz(II) a ligandum háromfogú koordinációját részesíti előnyben, míg a cink(II) a négyfogúként történő koordinációt. A CuLH komplex kedvezményezett kialakulása figyelhető meg hasonló egy vagy két propil-oldallánccal rendelkező aszimmetrikus, tripodális poliamin esetén is [52]. Ligandumfelesleg alkalmazása mellett (18.B ábra) meglepő módon csak réz(II) jelenlétében képződnek bisz-komplexek, míg a cink(II)tartalmú rendszerben nem alakulnak ki ilyen részecskék. Az irodalomban tárgyalt négyfogú tripodális ligandumok – melyek főként a trisz(2-aminoetil)-amin és a trisz(3-aminopropil)-amin származékai – oldategyensúlyi vizsgálatai szerint nem képződnek CuL_2H_x összetételű bisz-komplexek [52,53]. Az általunk tanulmányozott ligandum réz(II) és cink(II)ionokkal mutatott eltérő viselkedése és a korábbi eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a bimha a két fémion esetén különböző geometriát részesít előnyben. Ennek eldöntésére a réz(II)tartalmú rendszerben spektrofotometriás és ESR, míg a cink(II)tartalmúban ^1H NMR-méréseket végeztünk.

A réz(II)–bimha rendszerben képződő CuLH részecske spektrális sajátosságai ($g_0 = 2,124$, $A_0 = 47$ G, $a_{\text{N},0} = 11$, $g_{\perp} = 2,062$, $g_{||} = 2.234$, $A_{||} = 179$ G; $\lambda^{\text{d-d}}_{\text{max}} = 652$ nm, $\epsilon = 93$ M $^{-1}$ cm $^{-1}$) hasonlítanak a kutatócsoportunk által már tanulmányozott N-(imidazol-4-ilmetil)-hisztamin (imha) analóg CuL komplexe esetén detektált paraméterekre ($g_0 = 2,124$, $A_0 = 55$ G, $a_{\text{N},0} = 11$, $g_{\perp} = 2,060$, $g_{||} = 2.237$, $A_{||} = 168$ G; $\lambda^{\text{d-d}}_{\text{max}} = 634$ nm, $\epsilon = 59$ M $^{-1}$ cm $^{-1}$). Az imha tulajdonképpen a bimha háromfogú részegységeként fogható fel, melyben a donorcsoportok $\{2\text{N}_{\text{im}}, \text{NH}\}$ koordinációval, torzult oktaéderes környezetben helyezkednek el. Ezek alapján a bimha CuLH komplexe esetén is torzult oktaéderes szimmetriával bíró $\{2\text{N}_{\text{im}}, \text{NH}\}$ koordinációjú réz(II)komplex képződik.



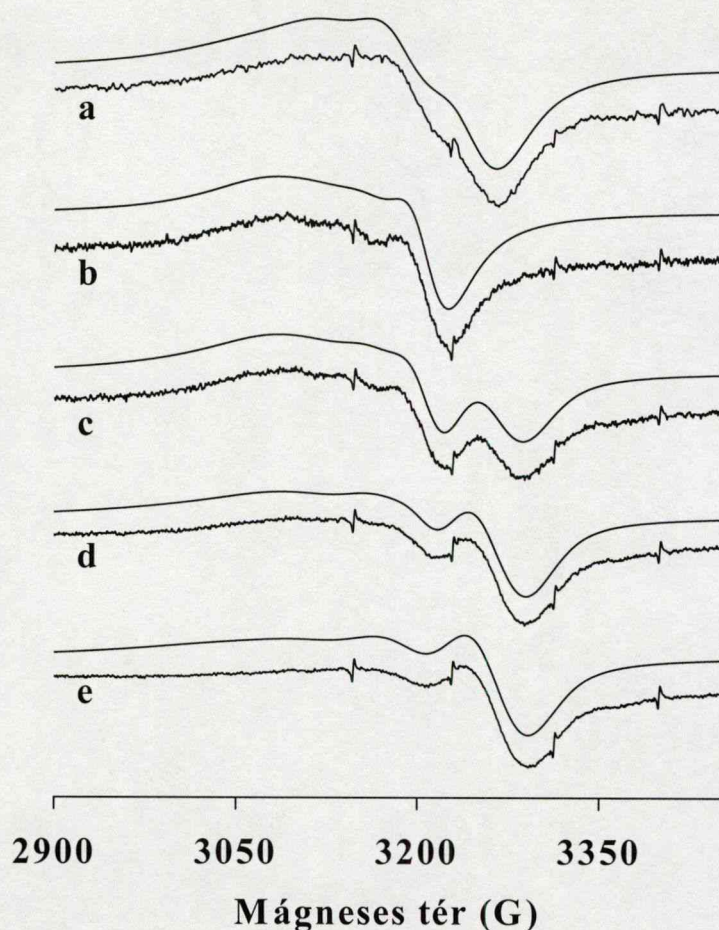
18. ábra A fém(II)–bimha rendszer eloszlásgörbéi

M (A,a), MLH_2 (B), MLH (C,c), ML (D,d), ML_2H_2 (E), ML_2H (F), ML_2 (G)

$[Cu(II)] = [L] = 1:1$ (A) illetve $1:3$ (B) (folyamatos vonal és nagybetű)

$[Zn(II)] = [L] = 1:1$ (A) illetve $1:2$ (B) (szaggatott vonal és kisbetű)

$[Cu(II)] = [Zn(II)] = 0,005$ M; $T = 298$ K, $I = 0,1$ M NaCl

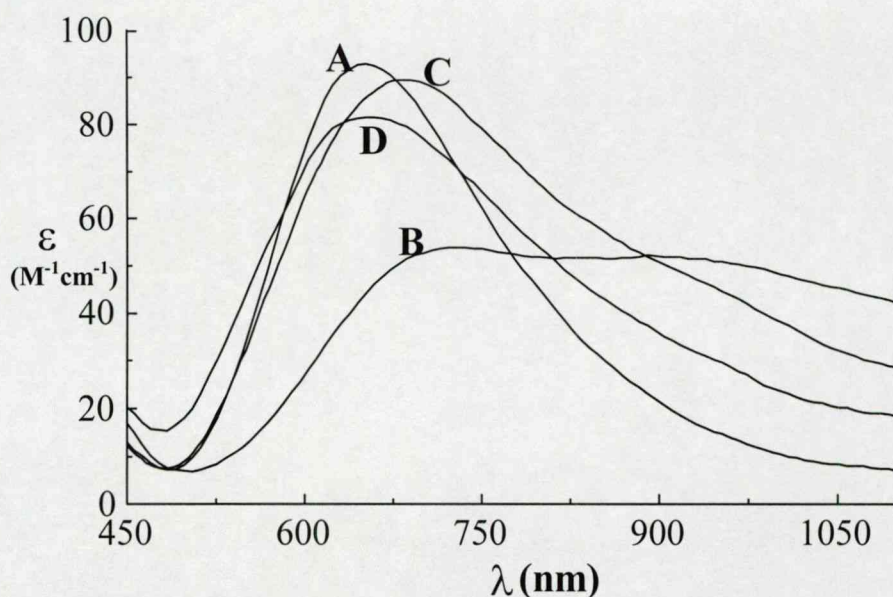


19. ábra Mért és illesztett ESR-spektrumok a réz(II)–bimha rendszerben

$[L] = [M(II)] = 0,005\text{ M}$ (a,b), $[L] = 3 \times [M(II)] = 0,015\text{ M}$ (c-e),
 $pH = 3,00$ (a), $6,45$ (b), $5,71$ (c), $6,50$ (d) illetve $8,21$ (e), $T = 298\text{ K}$.

A réz(II)–bimha rendszerben képződő két domináns részecske (CuLH és CuL) ESR-spektrumai (19. ábra) alapvetően különböznek egymástól. A CuL esetén meghatározott paraméterek ($g_0 = 2,137$, $A_0 = 37\text{ G}$, $g_{\perp} = 2,065$, $g_{||} = 2,277$, $A_{||} = 134\text{ G}$, $A_{\perp} = -16\text{ G}$, ahol a negatív csatolási állandó értéke az $A_0 = 1/3 (A_{||} + 2A_{\perp})$ összefüggés alapján lett számolva) valamint a spektrofotometriásan is követett titrálás eredményei (20. ábra) geometriaváltásra utalnak. A valószínűleg torzult oktaéderes szimmetriával rendelkező CuLH összetételű komplex deprotonálódásával és a negyedik donorcsoport koordinálódásával létrejövő komplex igen kis csatolási állandókkal rendelkezik. Egyedi UV-VIS spektrumán pedig két közel azonos intenzitású d-d átmeneti maximum jelenik meg ($\lambda_1 = 728\text{ nm}$, $\varepsilon = 54\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\lambda_2 \sim 900\text{ nm}$, $\varepsilon = 52\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), ami ötös koordinációval bíró, négyzetes piramisos vagy trigonális bipiramisos szerkezetű részecskékre jellemző [20,46,48,52,90-93]. A két sáv közel

egyező intenzitása a négyzetes piramis és a trigonális bipiramis közti átmeneti szerkezet kialakulására utal [92,93]. A trigonális bipiramisos szimmetriájú réz(II)komplexek ESR-spektruma úgynevezett “fordított” axiális spektrum ($g_{\perp} > g_{\parallel}$), míg a négyzetes piramisos részecskék – mint esetünkben (19. ábra) – tipikus tetragonális axiális képet mutatnak ($g_{\parallel} > g_{\perp}$) [46,92,93]. A CuL komplex spektroszkópiás eredményei alapján tehát olyan torzult ötös koordinációjú részecske kialakulását valószínűsíthetjük, amely a trigonális bipiramisos és a négyzetes piramisos szerkezetek átmeneteként értelmezhető, de inkább az utóbbihoz áll közel. Megállapítható tehát, hogy a CuLH-ban a bimha háromfogú meridionális (egy síkban történő) koordinációja még megengedi a torzult oktaéderes szimmetriát, de a tripodális ligandum négyfogúként történő kapcsolódása már ötös koordinációjú komplex kialakulását eredményezi.



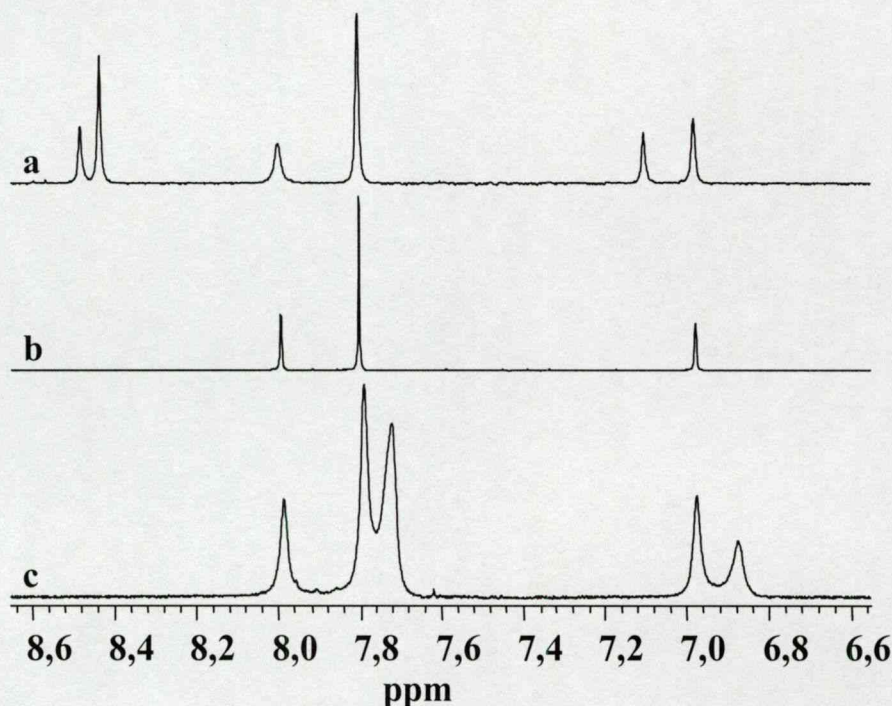
20. ábra A réz(II)–bimha rendszerben nagy mennyiségben képződő részecskék
A: CuLH, B: CuL, C: CuL₂H és D: CuL₂ egyedi spektrumai

A réz(II)ionok jelenlétében képződő bisz-komplexek (Cu₂LH_x, x = 0-2) ESR és látható spektrumai (19. és 20. ábra) nagymértékben különböznek az előzőekben tárgyalt CuL megfelelő spektrumaitól. Ezek alapján a bisz-komplexek esetében a fémion körül újra tetragonális geometria kialakulása valószínűsíthető (CuL₂H: $\lambda^{d-d}_{max} = 686 \text{ nm}$, $\epsilon = 90 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ illetve CuL₂: $\lambda^{d-d}_{max} = 660 \text{ nm}$, $\epsilon = 82 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), habár a látható spektrumon 900-950 nm körül még gyengén megfigyelhető az ötös koordinációra jellemző d-d átmeneti sáv. A három bisz-komplex egyedi ESR-paramétereit nem lehetett meghatározni, mivel valószínűleg ezek a részecskék nem különböznek egymástól az ekvatoriális síkban kötődő donorcsoportok

trigonális bipiramis?

tekintetében. Az ESR-spektrumok viszont jól leírhatók a CuL és egy másik ekvatoriális síkjában négy nitrogéndonoratomot tartalmazó részecske feltételezésével. A két részecske koncentrációaránya megfelel a pH-metriásan meghatározott eloszlásgörbék alapján számított CuL mennyiségének illetve a három bisz-komplex összegének arányával.

A cink(II)–bimha rendszerben ^1H NMR-vizsgálatokkal próbáltunk további információt szerezni. A szabad ligandum és a cink(II)–bimha 1:1 rendszer esetén meghatározott kémiai eltolódásértékeket az 3. táblázat tartalmazza, néhány spektrumrészlet pedig a 21. ábrán látható. Ekvimoláris összetételnél pH 3 fölött a ZnL kialakulásával párhuzamosan egy új jelcsoport jelenik meg, ami ezen komplex lassú ligandumcsere-sebességére utal. Az imidazolgyűrűk protonjainak jelei a komplexképződés hatására jelentős mértékben eltolódnak a nagyobb terek irányába. Emellett a ZnL kialakulásával a ligandum alifás protonjainak tekintetében is jelentékeny változások figyelhetők meg, valamint a szabad ligandum két rövidebb oldalláncának metilénsoportjához tartozó szingulett egy tipikus AB kvartetté alakul át a komplexképződés hatására. A metilén protonok mágneses inekvivalenciáját a ligandum négyfogúként történő koordinációjával magyarázhatjuk, hiszen ezáltal megszűnik a C–C/N kötések mentén történő szabad rotáció.



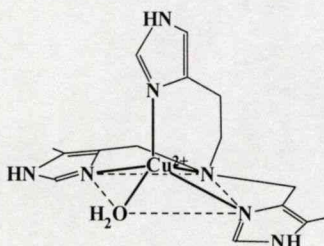
21. ábra ^1H NMR-spektrumrészletek a cink(II)–bimha rendszerben
 $[L] = [M] = 0,006\text{ M}$, $\text{pH} = 3,60$ (a); $[L] = [M] = 0,006\text{ M}$, $\text{pH} = 6,80$ (b);
 $[L] = 2 \times [M] = 0,012\text{ M}$, $\text{pH} = 7,27$ (c)

3. táblázat *A cink(II)–bimha 1:1 rendszer illetve a ligandum ^1H NMR-spektrumaiból meghatározott kémiai eltolódásértékek ppm-ben megadva, $T = 298\text{ K}$.*

	pH	$\text{C}_{\text{ha}}^2\text{H}$	$\text{C}_{\text{im}}^2\text{H}$	$\text{C}_{\text{ha}}^5\text{H}$	im- $\text{CH}_2\text{-NH}$	NH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-ha}$	$\text{CH}_3\text{-im}$
bimha	6,80	7,849	7,805	6,909	3,987	3,126, 2,897 ^b	2,137
*bimha	11,30	7,568	7,546	6,714	3,552	2,702 ^a	2,057
bimha-Zn(II)	6,80	7,993 ^c	7,802	6,979	3,792, 3,624 ^d	2,904, 2,734 ^e	2,136

* teljesen deprotonált ligandum; ^a multiplett; ^b két tripllett, $^3J = 7,3\text{ Hz}$; ^c négy kötésen keresztüli csatolás a $\text{C}_{\text{im}}^5\text{H}$ részvételével, $^4J = 1,4\text{ Hz}$; ^d AB kvartett, $^2J = 14,9\text{ Hz}$; ^e két enyhén torzult tripllett, $^3J \sim 5,3\text{ Hz}$.

Kétszeres ligandumfelesleget alkalmazva a kapott spektrum a pH-metriás mérésekkel egyező módon a ZnL komplex és a szabad ligandum jelenlétének megfelelően alakul, vagyis bisz-komplexek képződésére utaló bizonyítékot az NMR-mérések sem szolgáltatottak. Felmerül a kérdés, hogy mi lehet az oka annak, hogy a 6N koordinációt is kedvelő cink(II)ion jelenlétében nem alakulnak ki bisz-komplexek, ugyanakkor réz(II)ionokkal képződnek ilyen komplexek, holott a Jahn-Teller torzulás miatt a 6N koordináció általában nem preferált a réz(II)komplexek esetén. Erre a CuL és a ZnL komplexek előzőekben sugallt eltérő geometriája tűnik a legvalószínűbb magyarázatnak. A CuL esetén az eredmények alapján négyzetes piramisos szerkezet alakul ki, amit úgy képzelhetünk el, hogy az ekvatoriális síkban két imidazolnitrogén és a tercier aminonitrogén helyezkedik el illetve a harmadik imidazolcsoport axiálisan koordinálódik (22. ábra). Ezzel szemben a ZnL feltételezhetően trigonális bipiramisos szerkezettel bír – ebben az esetben valószínűleg ekvatoriális pozícióban helyezkedik el a három imidazolnitrogén és axiálisan koordinálódik a tercier aminonitrogén – ami kétszeres ligandumfelesleg hatására sem rendeződik át oktaéderes geometriájú részecskévé. Az ML komplexek eltérő geometriája magyarázatot adhat a biszkomplexxképződés terén tapasztalt viselkedésre, nevezetesen a CuL komplex szabad ekvatoriális pozíciója révén könnyen átrendeződhet oktaéderes részecskévé a biszkomplexxképződés során.



22. ábra *A réz(II)–bimha rendszerben képződő CuL komplex vázlatos szerkezete*

4.3. Többfogú, lineáris szerkezetű imidazolszármazékok réz(II)- és cink(II)komplexei

A 8. ábrán látható négyfogú bimdm és mbimdm névvel rövidített ligandumokat Jean-Baptiste Verlhac és munkatársai bocsátották rendelkezésünkre. A bimdm ligandumból előállított vegyes vegyértékű mangánkomplexszel $[Mn_2^{III,IV}O_2(bimdm)_2](ClO_4)_3 \cdot H_2O$ a kutatók a növények oxigéntermelő központját modellezték [47]. Elsőként a ligandumok protonálódási folyamatait vizsgáltuk, a potenciometriásan meghatározott protonálódási állandókból meghatározott pK értékeket a 4. táblázat tartalmazza. Emellett az analóg N,N'-bisz(imidazol-4-ilmetil)-etán-1,2-diamin (bimd) megfelelő adatait is feltüntettem a táblázatban, melyet Gruenwedel vizsgált [45].

4. táblázat A bimd és az mbimdm protonálódási állandói valamint réz(II)- illetve cink(II)ionokkal alkotott komplexeik képződési állandói ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,1\text{ M NaClO}_4$, a becsült hibaértékek zárójelben)

	bimd*		bimdm		mbimdm	
pK ₁	3,21		1,90(2)		< 1,80	
pK ₂	4,26		3,76(1)		2,96(2)	
pK ₃	6,56		6,26(1)		6,28(1)	
pK ₄	9,05		8,75(1)		7,51(1)	
M _x L _y H _z	Cu(II)	Zn(II)	Cu(II)	Zn(II)	Cu(II)	Zn(II)
111	--	--	--	14,12(3)	--	13,71(3)
110	11,43	10,39	16,55(2)	11,12(1)	16,67(3)	11,92(1)
11-1	--	--	--	--	6,55(3)	1,61(1)
log K _{ML,korr} [#]	-11,65	-12,69	-4,12	-9,55	~(-1,3)	~(-6,1)
Kísérleti pontok száma			324	386	304	293
Illesztési paraméter (cm ³)			0,007	0,005	0,003	0,004

* irodalmi adatok [45], [#]log K_{ML,korr} = log β₁₁₀ – ΣpK

Az aminocsoportok nagyobb bázicitásának köszönhetően mindhárom ligandum esetében elsőként valószínűleg az imidazolgyűrűk fognak deprotonálódni. Összehasonlítva az aminocsoportokhoz rendelt pK-kat (pK_3 és pK_4) elmondhatjuk, hogy az általános tendenciának megfelelően az analóg bimdm szekunder aminocsoportjai bázikusabbak, mint az általunk vizsgált ligandumok tercier nitrogénjei. Másrészt az aminocsoportok metilezése erősen befolyásolja az imidazolcsoportok pK-ít (pK_1 és pK_2) is, mint ahogy ezt a bimdm és a bimdm összehasonlításából láthatjuk. Mivel az imidazolcsoportok mindkét ligandum esetén viszonylag távol helyezkednek el egymástól, de a metilezett nitrogéntől is, ezért a bimdm esetén mért alacsonyabb pK értékekre a metilcsoportoknak köszönhetően kialakuló kisebb mértékű hidratáció tűnik a legvalószínűbb magyarázatnak. Az imidazolgyűrűk 1-es pozícióban lévő nitrogénjeinek metilezése még tovább csökkenti az imidazolcsoportok pK-ít (ld. mbimdm), ami látszólag ellentmond az elektronküldő metilcsoport bázicitásnövelő hatásának. A jelenséget számos tényező együttes hatásának figyelembevételével magyarázhatjuk. Például az imidazolgyűrű N^1 -es nitrogénjének metilezése révén megszűnik a tautomerizáció, így a pK-t a sokkal savasabb N^3 -as nitrogén határozza meg illetve a további metilezés hatására a molekula hidratációja még kevésbé válik kedvezményezetté.

A komplexképző sajátságokat réz(II)- illetve cink(II)ionokkal tanulmányoztuk, a komplexek képződési állandóit a 4. táblázat tartalmazza. A bimdm esetén mindkét fémion jelenlétében $pH = 9,5$ fölött csapadékképződést tapasztaltunk, ezért magasabb pH-n nem végeztünk egyensúlyi vizsgálatokat. Mindhárom ligandum $pH = 4-9$ között réz(II)- illetve cink(II)ionokkal is rendkívül stabil $\{2N_{im}, 2N_{am}\}$ koordinációjú ML komplexeket alakít ki. Ezen komplexek bázicitással korrigált képződési állandói épp az ellenkező tendenciát mutatják a donorcsoportok bázicitása alapján várható sorrenddel, vagyis a kisebb bázicitású metilezett származékok erősebb donorsajátságokkal rendelkeznek. A bimdm CuL komplexének spektrális paraméterei jó egyezést mutatnak hasonló $\{2N_{am}, 2N_{im}\}$ koordinációval bíró komplexekkel, mint például a kutatócsoportunk által tanulmányozott bisz[4-imidazol-4-ilmetil]-imidazol-2-il]metán (tim) és a hisztamin bisz-komplexével (5. táblázat). Az mbimdm CuL komplexének paraméterei azonban eltérő koordinációs szférát sejtetnek, a mért elnyelési maximum értéke ($\lambda^{d-d}_{max} = 634 \text{ nm}$) jóval nagyobb, mint ami négy nitrogén ekvatoriális síkban történő koordinációjának feltételezésével jósolható, bár ez a His-Gly bisz-komplexénél ($\lambda^{d-d}_{max} = 630 \text{ nm}$) is nagyobb a vártnál. Emellett a g értékek nagyobbak, az $A_{//}$ pedig jóval alacsonyabb, ezért mivel a pH-metriás adatok egyértelműen $\{4N\}$ koordinációt valószínűsítene, a mért adatok jelentős mértékű rombos torzulásra

utalnak. Mindkét fémion esetén pH 9 fölött további deprotonálódás figyelhető meg, ami csak az mbimdm ligandum jelenlétében vezet vízzeloldható MLH₁ összetételű komplex kialakulásához. Mivel ebben az esetben az imidazolgyűrű N¹-es nitrogénje metilezve van, ezért a képződő MLH₁ részecske tulajdonképpen ML(OH) összetételű hidroxo vegyeskomplex. Az extra deprotonálódás hatására megváltoznak az ESR-paraméterek, így az ML(OH) kialakulása a koordinációs szféra átrendeződésével képzelhető el, nevezetesen az egyik imidazolgyűrű axiális pozícióba kerül, míg a hidroxidion az ekvatoriális síkban kötődik, vagyis a {4N} koordináció erős kötőmód ugyan, de csak a savas pH-tartományban. A cink(II)tartalmú rendszerekben MLH összetételű protonált komplex is képződik, amelyben valószínűleg három nitrogén koordinálódik a fémhez.

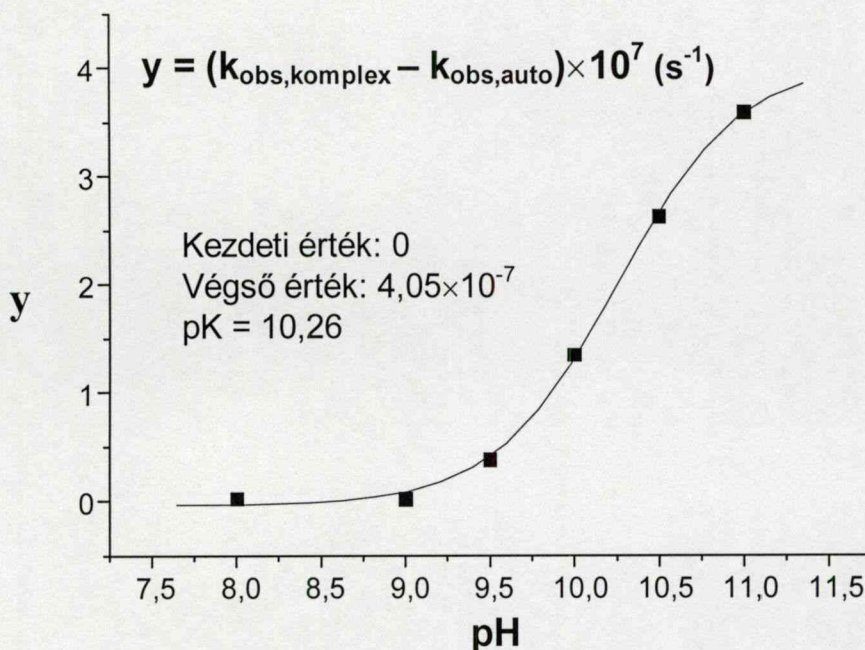
5. táblázat *A bimdm és az mbimdm réz(II)komplexeinek spektrális paraméterei*
(*T = 298 K, I = 0,1M NaClO₄*)

	Cu _x L _y H _z	λ ^{d-d} _{max} nm	g ₀	A ₀	g	g _⊥	A	A _⊥
bimdm	110	614	2,120	74 G	2,230	2,065	173 G	21 G
mbimdm	110	634	2,145	60 G	2,280	2,077	130 G	25 G
	11-1	630	2,132	65 G	2,273	2,061	163 G	17 G
His-Gly*	120	630	--	--	2,247	2,044	186 G	--
tim*	110	610	2,118	70 G	2,234	2,062	179 G	16 G
hisztamin**	120	600	2,110	76 G	--	--	--	--

*irodalmi adatok [44,94,95]; **általunk meghatározott paraméterek

4.3.1. Kinetikai mérések a cink(II)–mbimdm rendszerben

Az mbimdm esetén képződő vízdoldható hidroxó vegyeskomplex foszfátészterkötés hidrolízist elősegítő hatását is tanulmányoztuk. Kinetikai méréseinket 50 fokon hajtottuk végre és az aktivált bisz(4-nitrofenil)-foszfátot alkalmaztuk szubsztrátként. A 23. ábra az autohidrolízissel korrigált pszeudo elsőrendű sebességi együtthatók pH-függését mutatja az említett rendszerben. A hidrolitikus hatás növekedése jó egyezést mutat a potenciometriasan meghatározott ZnLH_1 komplex képződésével. A komplexképződésre vonatkozóan potenciometriasan 10,31-es, míg a kinetikai adatokból 10,26-os pK határozható meg. Ezek alapján a lejátszódó mechanizmusra a fémhez kötött hidroxidion által megvalósított intramolekuláris nukleofil hidrolízist javasoljuk. A ZnLH_1 komplex teljes kialakulásánál mért hidrolitikus aktivitás jelentősnek mondható, valamivel nagyobb a sokszor vizsgált és így klasszikus példaként említhető cink(II)-triazaciklododekán komplexénél, azonban utóbbinál jóval magasabb pH-n éri el maximális hatását, így biológiai modellként kevésbé releváns. Ennek köszönhetően további kinetikai vizsgálatokat ebben a rendszerben nem végeztünk.



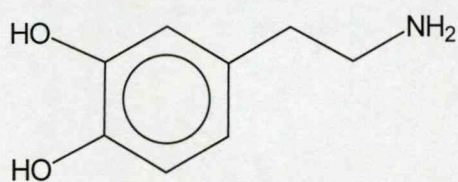
23. ábra Az autohidrolízissel korrigált pszeudo elsőrendű sebességi együtthatók pH-függése a cink(II)–mbimdm rendszerben

$[\text{Zn(II)}] = [\text{mbimdm}] = 2,33 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{bnpp}] = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$, $T = 323 \text{ K}$

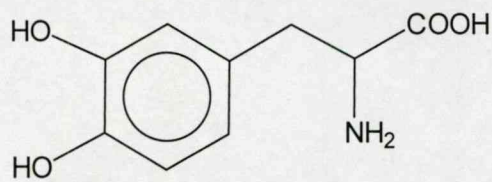
4.3.2. Vegyesligandumú komplexek képződése katecholokkal

Érdekes lehet azonban imidazoltartalmú ligandumaink fémkomplexeinek stabilitását egyéb ligandumokkal szemben is megvizsgálni. Az élő szervezetben hatásukat részben hormonként, részben neurotranszmitterként kifejtő katecholaminok számos biokémiai folyamatban nélkülözhetetlen szerepet töltenek be. A Parkinson-kór kezelésében hosszú ideje alkalmazzák a dopamin prekursoraként funkcionáló L-dopa-t, hatékonyságának növelése fémkomplexeitől remélhető. Mindezek mellett a katecholaminok szállításában és raktározásában a vegyesligandumú komplexek kialakulása jelentékeny szerepet játszhat, valamint néhány metalloprotein pl. tirozináz esetén a katecholát dianion közvetlenül koordinálódik a központi fémionhoz, ezért imidazoltartalmú ligandumaink (mint lehetséges modellvegyületek) katecholaminokkal, nevezetesen dopaminnal és L-dopával (24. ábra) alkotott terner rendszereit is megvizsgáltuk. Mivel a terner rendszerek pontos leírásához szükségünk van a biner rendszerek komplexképződésének pontos ismeretére, ezért újra meghatároztuk a vizsgált katecholaminok réz(II)- és cink(II)ionokkal alkotott komplexeinek képződési állandóit az általunk alkalmazott kísérleti körülmények mellett (6. táblázat).

A kapott eredmények jó egyezést mutatnak a korábbi vizsgálatokkal [96-98]. Komplexképző sajátágaikra az jellemző, hogy a dopa alacsony pH-n aminosavszerűen, magasabb pH-n katecholszerűen koordinálódik, semleges pH-n pedig a vegyes kötésmód a jellemző. A dopamin esetén azonban az aminocsoport gyenge koordinációs képessége miatt csak katechol típusú koordinációra nyílik lehetőség.



dopamin



L-dopa

24. ábra A tanulmányozott katecholaminok vázlatos szerkezete

6. táblázat *A dopamin, az L-dopa és a glicin protonálódási állandói valamint réz(II)- illetve cink(II)ionokkal alkotott komplexeik képződési állandói*

*($T = 298\text{ K}$, $I = 0,1\text{ M NaClO}_4$, a becsült hibaértékek zárójelben, * irodalmi adatok [96-98])*

$M_xL_yH_z$	dopamin		L-dopa		glicin	
	Cu(II)	Zn(II)	Cu(II)	Zn(II)	Cu(II)	Zn(II)
011	13,1*		13,4*		9,563(4)	
012	23,434(8)		23,221(6)		11,921(7)	
013	32,247(8)		31,940(6)		--	
014	--		34,103(14)		--	
112	--	--	30,69(1)	27,03(7)	--	--
111	24,26(1)	20,21(1)	--	20,29(2)	--	--
110	16,31(2)	--	--	--	8,11(1)	4,71(5)
124	--	--	60,51(1)	--	--	--
123	--	--	53,5(1)	47,12(3)	--	--
122	46,02(1)	38,86(1)	44,97(9)	38,40(2)	--	--
121	35,81(1)	28,66(2)	35,14(9)	28,55(3)	--	--
120	25,09(1)	18,05(1)	25,38(2)	18,12(2)	14,80(2)	9,15(3)
222	--	--	53,25(3)	--	--	--
221	--	--	47,51(4)	--	--	--
220	--	--	42,17(2)	--	--	--
N. P.	313	258	511	284	106	96
F. P.	0,003	0,003	0,003	0,005	0,003	0,007

N. P. = kísérleti pontok száma, F. P. = illesztési paraméter (cm^3)

A terner rendszerek vizsgálata során is a bimdm esetén mindkét fémion jelenlétében pH 9,5 fölött csapadékképződést tapasztaltunk, ezért magasabb pH-n nem végeztünk egyensúlyi vizsgálatokat. A vegyesligandumú részecskék képződési állandóit a 7. táblázat tartalmazza, a réz(II)–mbimdm–dopamin/L-dopa terner rendszerek eloszlásgörbéi a 25. és a 26. ábrán láthatóak. Mindkét imidazolszármazék katecholaminokkal MLAH_2 , MLAH illetve MLA összetételű vegyeskomplexeke képez, az eredmények alapján a vegyeskomplexe kialakulása csak pH = 6-7 körül indul, majd pH = 8-9 fölött válik dominánssá.

A ligandumok multidentát jellege miatt a képződött vegyeskomplexekre többféle szerkezet is elképzelhető, ezért a koordinálódó donorcsoportok valószínűsítésére egyrészt spektrofotometriás vizsgálatokat végeztünk, másrészt néhány egyszerűbb modellrendszert is tanulmányoztunk. Annak eldöntésére, hogy az imidazolszármazékok vajon hisztaminszerűen esetleg három- vagy négyfogúként koordinálnak a fémhez, megvizsgáltuk a réz(II)/cink(II)–hisztamin–dopamin/L-dopa rendszereket is. Emellett a réz(II)/cink(II)–mbimdm–glicin rendszereket is tanulmányoztuk azért, hogy az L-dopa aminosavszerű koordinációs módját modellezzük. A meghatározott képződési állandók (7. táblázat) jó egyezést mutatnak az analóg réz(II)/cink(II)–hisztidin–dopamin/L-dopa illetve réz(II)/cink(II)–hisztamin–pirokatechol rendszerekkel [99,100].

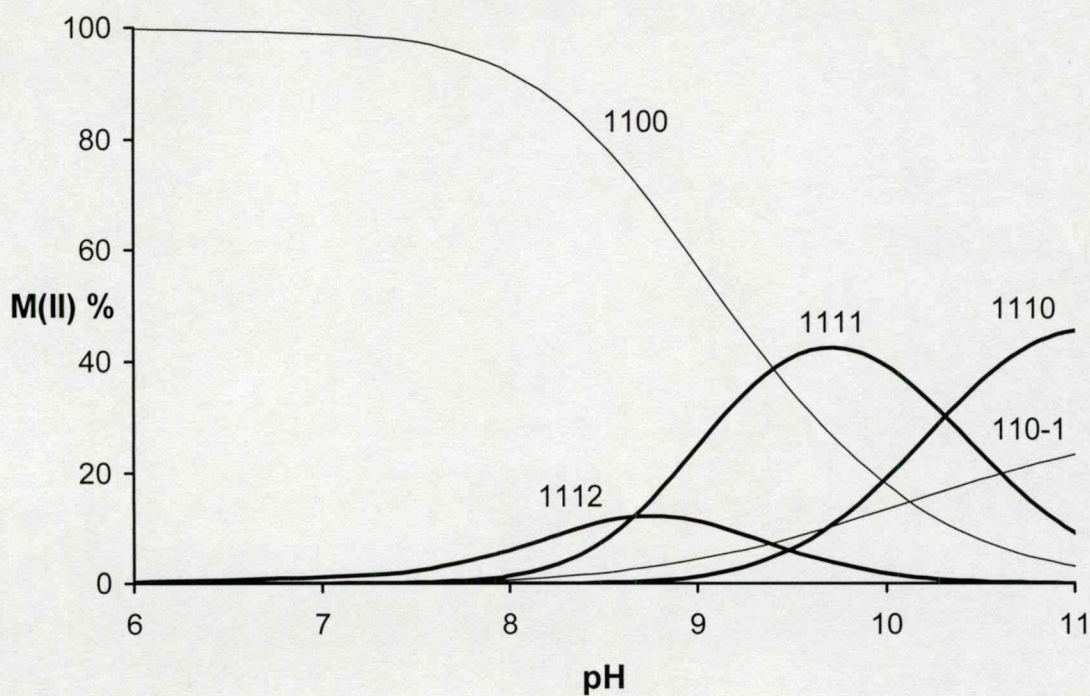
7. táblázat A vizsgált rendszerekben képződő vegyesligandumú komplexek

$$\text{képződési állandói, } \beta_{pqrs} = [M_p L_q A_r H_s] / [M]^p [L]^q [A]^r [H]^s$$

(*T* = 298 K, *I* = 0,1 M NaClO₄, a becsült hibaértékek zárójelben)

	L	hisztamin		bimdm		mbimdm	
A	pqrs	Cu(II)	Zn(II)	Cu(II)	Zn(II)	Cu(II)	Zn(II)
dopamin	1112	--	--	42,56(5)	37,10(4)	42,23(4)	37,23(9)
L-dopa		40,29(1)	32,90(3)	42,54(3)	37,02(3)	42,64(2)	37,57(4)
dopamin	1111	33,24(1)	25,57(1)	33,83(2)	28,58(1)	33,57(1)	29,42(1)
L-dopa		32,65(2)	25,29(2)	33,66(2)	28,37(1)	33,70(1)	29,15(1)
dopamin	1110	22,99(1)	15,38(2)	23,81(3)	18,34(2)	23,26(2)	18,96(1)
L-dopa		22,81(3)	15,61(2)	24,05(2)	18,61(2)	23,57(2)	19,26(1)
glicin	110-1					19,82(1)	14,92(2)
glicin						8,65(4)	4,21(3)
dopamin	N. P.	276	266	275	256	275	250
L-dopa		279	251	223	249	200	264
glicin						307	301
dopamin	F. P.	0,006	0,007	0,008	0,007	0,008	0,007
L-dopa		0,007	0,007	0,005	0,006	0,006	0,007
glicin						0,006	0,007

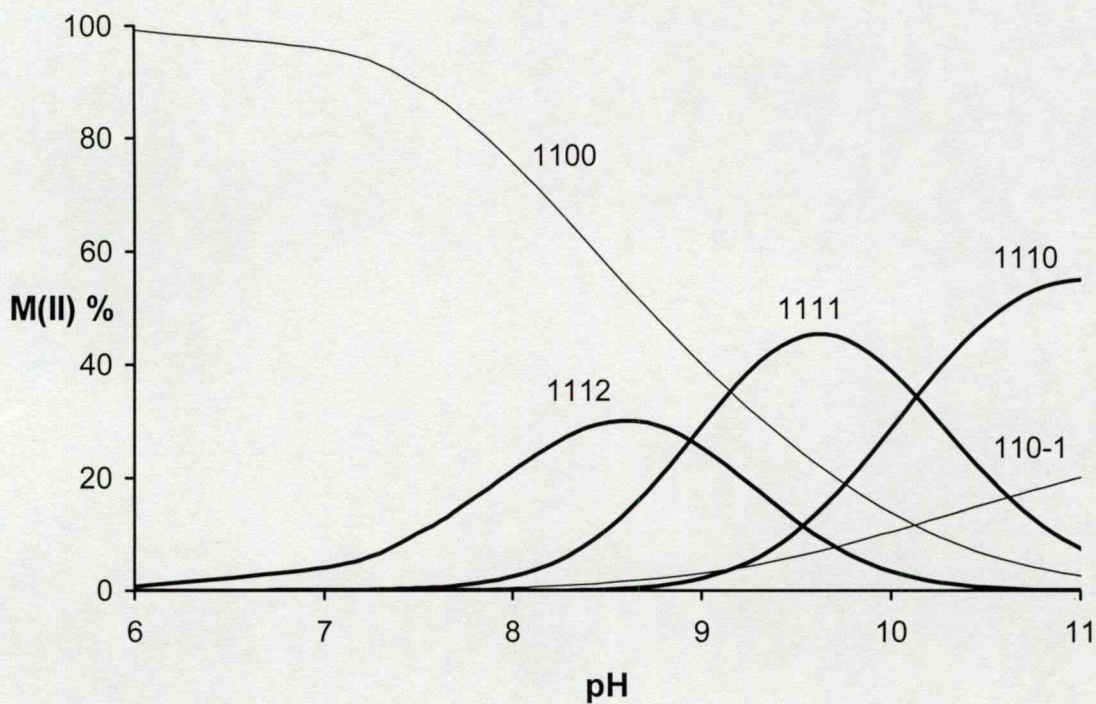
N. P. = kísérleti pontok száma, F. P. = illesztési paraméter (cm³)



25. ábra A réz(II)–mbimdm–dopamin rendszer eloszlásgörbéje

$[Cu(II)] = 0,0037\text{ M}$, $[mbimdm] = 0,004\text{ M}$ illetve $[dopamin] = 0,004\text{ M}$

($T = 298\text{ K}$, $I = 0,1\text{ M NaClO}_4$)



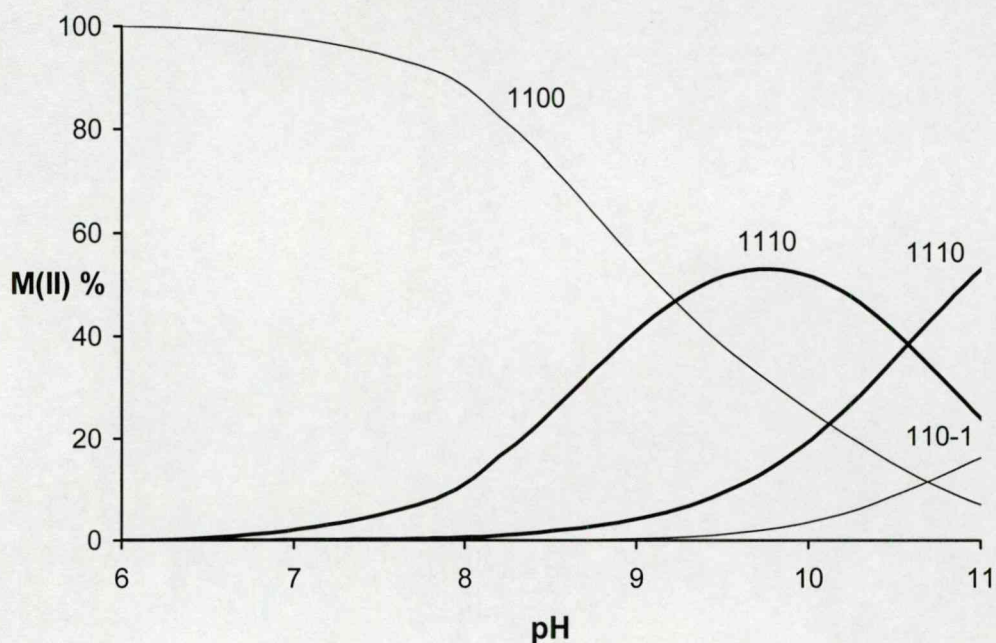
26. ábra A réz(II)–mbimdm–L-dopa rendszer eloszlásgörbéje

$[Cu(II)] = 0,0037\text{ M}$, $[mbimdm] = 0,004\text{ M}$ illetve $[dopa] = 0,004\text{ M}$

($T = 298\text{ K}$, $I = 0,1\text{ M NaClO}_4$)

Az L-dopa ambidentát jellegének köszönhetően glicin- és katecholszerű koordinációval is kötődhet. Réz(II) esetében, spektrofotometriásan is követett titrálások segítségével meghatároztuk az egyes komplexek egyedi spektrális paramétereit is (8. táblázat). A 28. és a 30. ábra a spektrumok pH-szerinti változását mutatja, a 29. és a 31. ábrán pedig az ezekből számolt egyedi spektrumok láthatók. Az eredmények arra utalnak, hogy a képződő CuLAH_2 komplexben az L-dopa, legalábbis részben, katecholszerűen koordinálódik, hiszen a 440 nm körül tapasztalt töltésátviteli sáv $\{\text{O}^-, \text{O}^-\}$ típusú koordinációra utal [101]. Ugyanakkor a glicintartalmú turner rendszer vizsgálatának tapasztalatai alapján (27. ábra) nem zárható ki teljes bizonyossággal az aminosavszerűen koordinálódó kötési izomer jelenléte sem, mivel $\text{pH} = 7-8$ fölött még egy egyszerű aminosav is képes megtörni a meglehetősen stabil ML komplex szerkezetét.

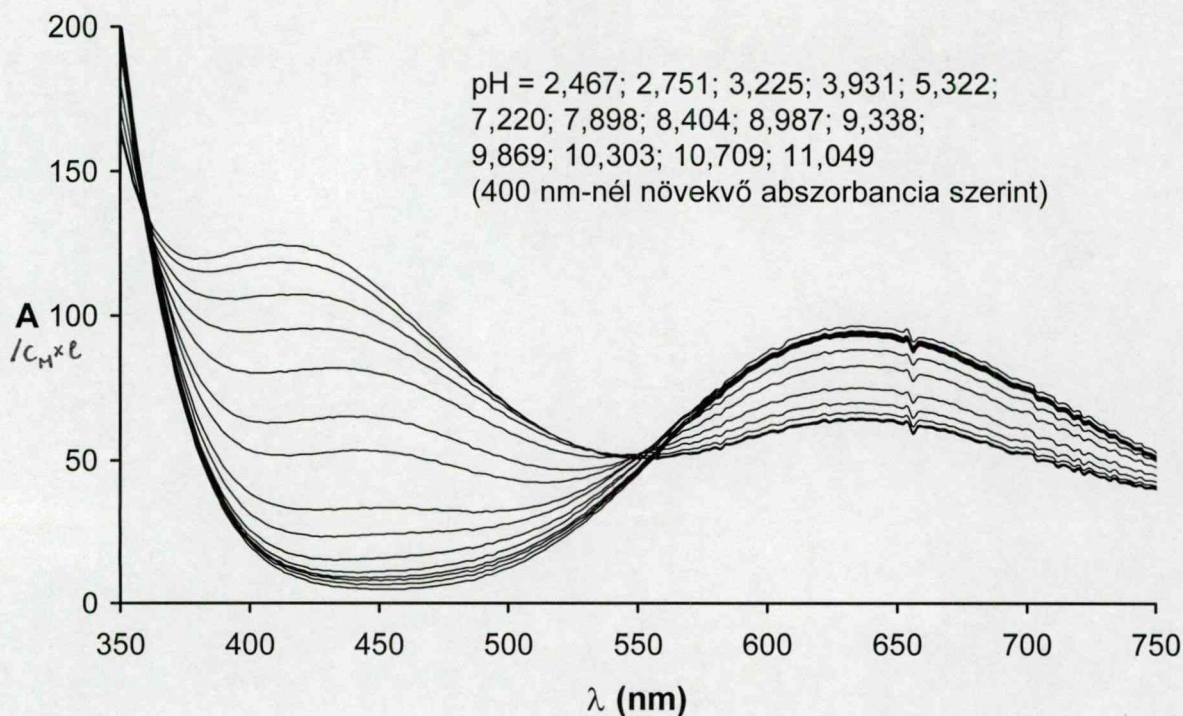
A dopamint tartalmazó turner rendszerekben kevés kétszeresen protonált vegyeskomplex képződik, valószínűleg ezért nem sikerült meghatároznunk a CuLAH_2 részecske egyedi spektrumát. Ebben az esetben nincs aminosavtípusú koordinációra lehetőség, ezért az L-dopát tartalmazó turner rendszerekre vonatkozó eredmények alapján katecholtípusú koordináció feltételezhető itt is. E komplexekben a katecholaminok láncvégi aminosocsoportja mellett az imidazoltartalmú ligandumok egyik nitrogénje (valószínűleg az egyik tercier aminosocsoport) van protonált állapotban.



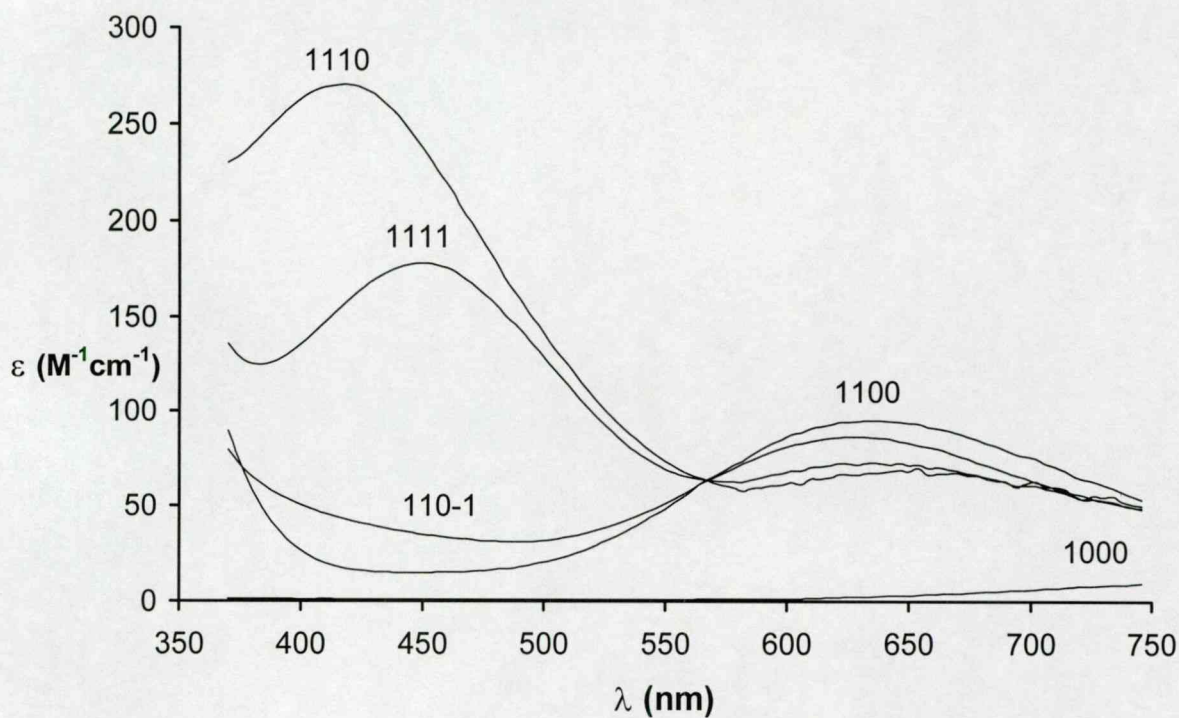
27. ábra A réz(II)–mbimdm–glicin rendszer eloszlásgörbéje

$[\text{Cu(II)}] = 0,0037 \text{ M}$, $[\text{mbimdm}] = 0,004 \text{ M}$ illetve $[\text{glicin}] = 0,004 \text{ M}$

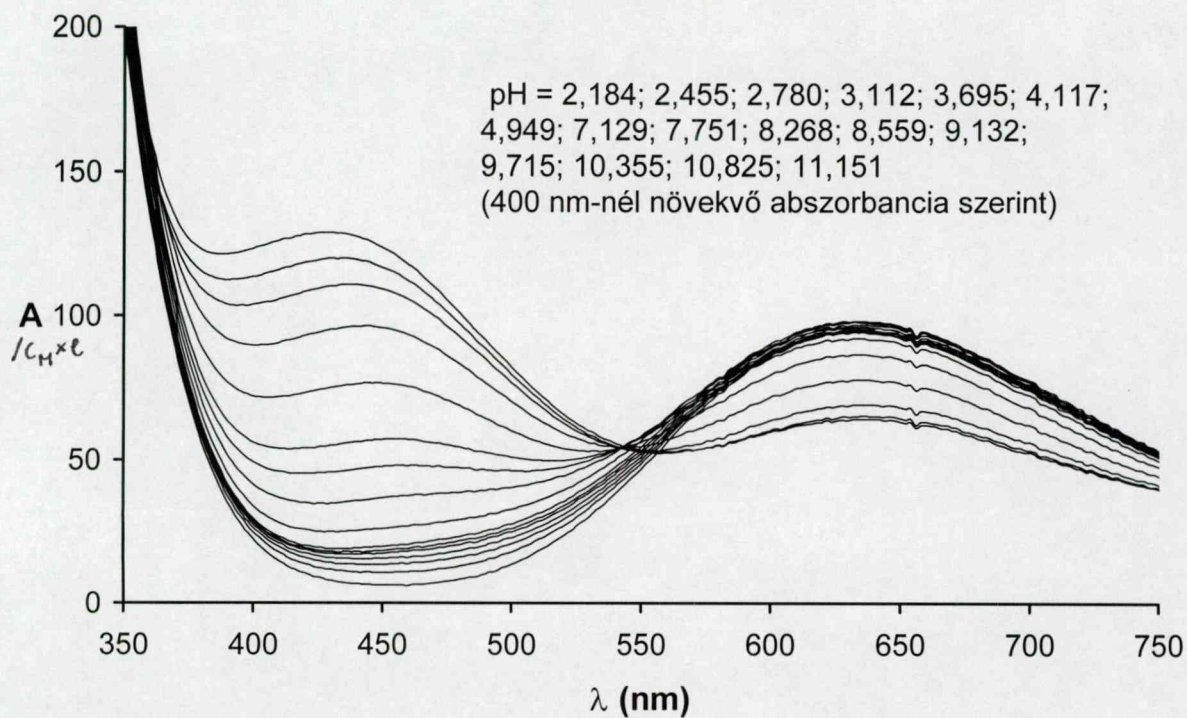
$(T = 298 \text{ K}, I = 0,1 \text{ M NaClO}_4)$



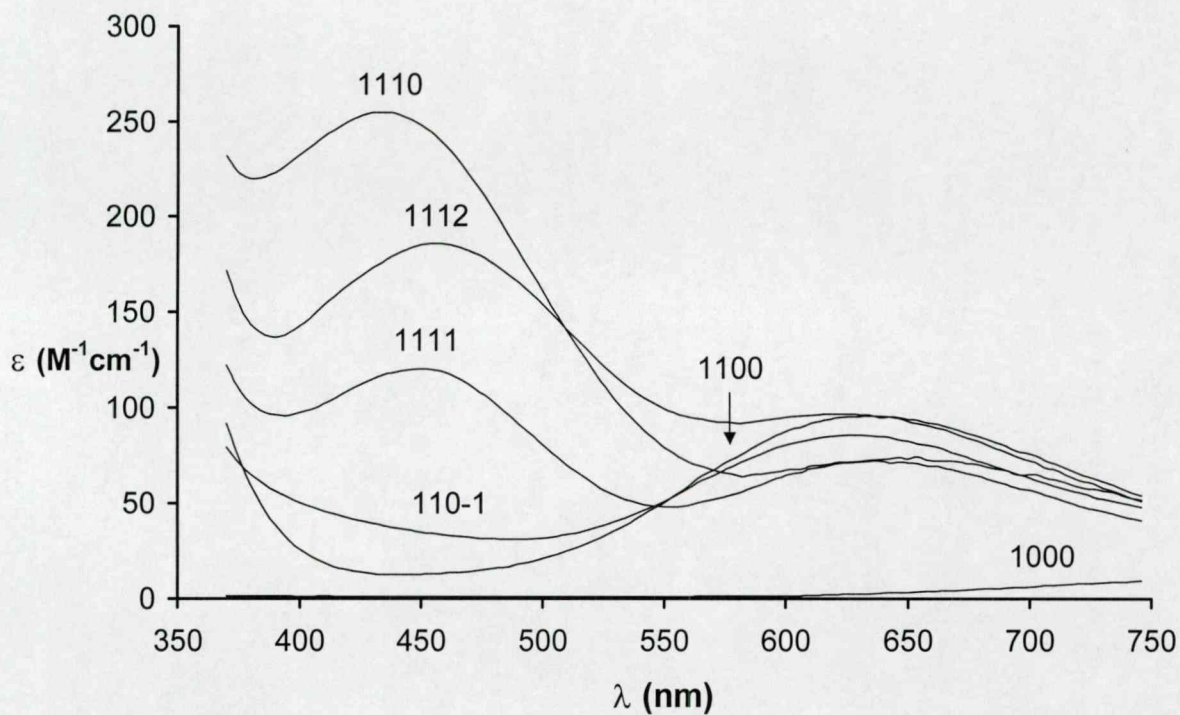
28. ábra UV-látható spektrumok a réz(II)–mbimdm–dopamin rendszerben
 $[Cu(II)] = 0,0015\text{ M}$, $[mbimdm] = 0,0016\text{ M}$ illetve $[dopamin] = 0,0016\text{ M}$
 $(T = 298\text{ K}, I = 0,1\text{ M NaClO}_4)$



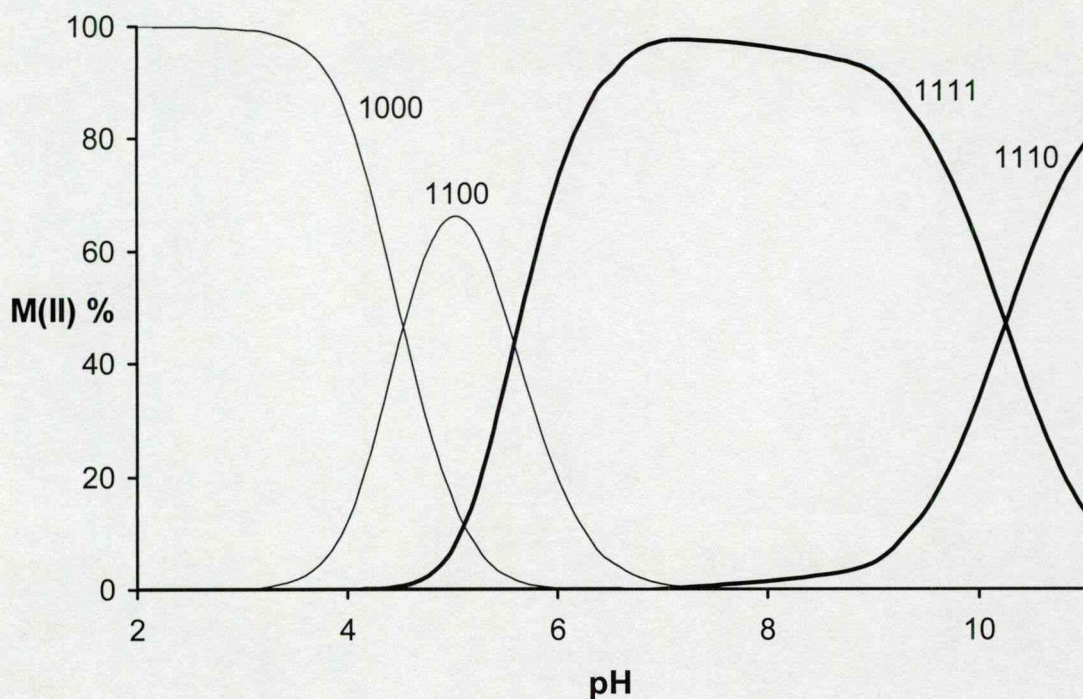
29. ábra A réz(II)–mbimdm–dopamin rendszerben képződő részecskék
 egyedi spektrumai (kísérleti körülmények az előző ábrán)



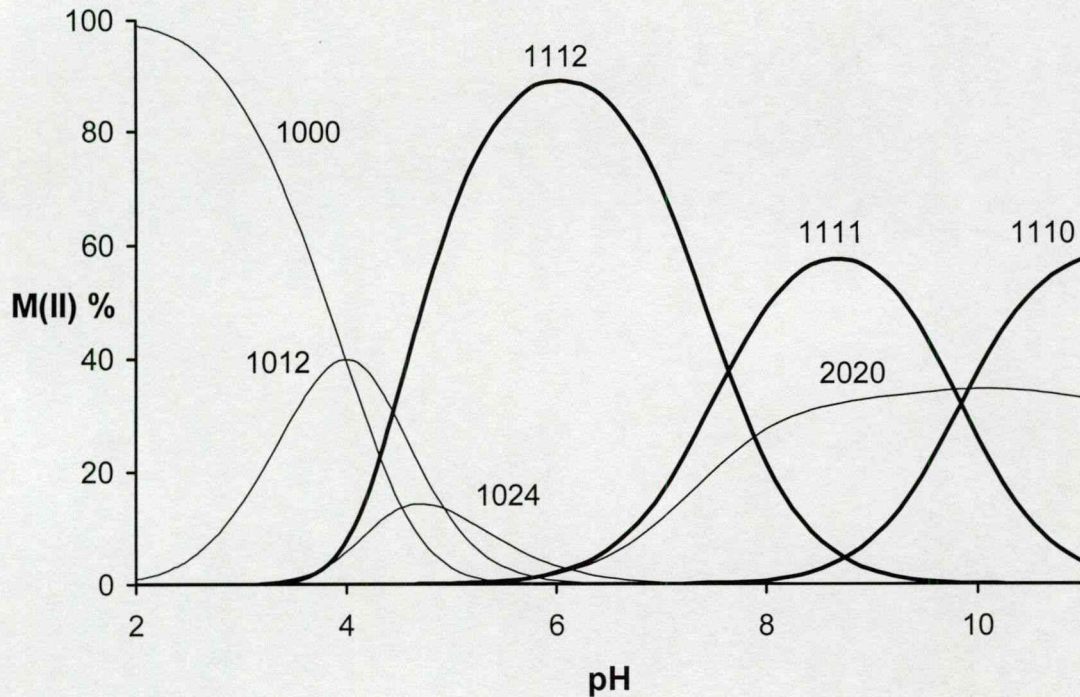
30. ábra UV-látható spektrumok a réz(II)–mbimdm–L-dopa rendszerben
 $[Cu(II)] = 0,0015\text{ M}$, $[mbimdm] = 0,0016\text{ M}$ illetve $[dopa] = 0,0016\text{ M}$
 $(T = 298\text{ K}, I = 0,1\text{ M NaClO}_4)$



31. ábra A réz(II)–mbimdm–L-dopa rendszerben képződő részecskék
 egyedi spektrumai (kísérleti körülmények az előző ábrán)



32. ábra A réz(II)–hisztamin–dopamin rendszer eloszlásgörbéje
 $[Cu(II)] = 0,0037 \text{ M}$, $[hisztamin] = 0,004 \text{ M}$ illetve $[dopamin] = 0,004 \text{ M}$
 $(T = 298 \text{ K}, I = 0,1 \text{ M NaClO}_4)$



33. ábra A réz(II)–hisztamin–L-dopa rendszer eloszlásgörbéje
 $[Cu(II)] = 0,0037 \text{ M}$, $[hisztamin] = 0,004 \text{ M}$ illetve $[dopa] = 0,004 \text{ M}$
 $(T = 298 \text{ K}, I = 0,1 \text{ M NaClO}_4)$

A következő MLAH összetételű komplex már a dopamint tartalmazó terner rendszerekben is nagy mennyiségben képződik. A komplexek egyedi spektrumai arra utalnak, hogy e komplexekben a catecholaminok megtartják kétfogú $\{O^-,O^-\}$ típusú koordinációjukat. A négyfogú imidazolszármazékok koordinációs módjáról a hisztamint tartalmazó terner rendszerek vizsgálatával próbáltunk információt szerezni. A meghatározott képződési állandókat a 7. táblázat tartalmazza, a kapott eloszlásgörbék a 32. és a 33. ábrán láthatóak. A réz(II)-hisztamin- L-dopa rendszerben pH 4 körül képződik a kétszeresen protonált $CuLAH_2$ komplex. Dopamin jelenlétében nem képződik az analóg összetételű részecske, a terner komplexek képződése csak pH 5 felett kezdődik, a szinte 100 %-os mennyiségben kialakuló $CuLAH$ összetételű komplex képződésével. A spektrális paraméterekből (8. táblázat) jól látszik, hogy az L-dopa jelenlétében számottevő mennyiségben képződő $CuLAH_2$ komplexben a catecholamin aminosavszerűen koordinálódik, mivel ebben az esetben nem jelentkezik a catecholtípusú koordinációra jellemző töltésátviteli sáv 400-450 nm körül. A képződő többi vegyeskomplex esetén ugyanakkor, a meghatározott paraméterek alapján a catecholaminok $\{O^-,O^-\}$ típusú koordinációjára következtethetünk.

8. táblázat *A képződő vegyesligandumú $[Cu_pL_qA_rH_s]$ komplexek spektrális paraméterei*
(A meghatározott elnyelési maximumok hibája ± 3 nm; $T = 298$ K, $I = 0,1$ M $NaClO_4$)

L	A	pqrs	λ^{CT}_{max}	ε^{CT}_{max}	λ^{d-d}_{max}	ε^{d-d}_{max}
hisztamin	dopamin	1111	438	134	612	67
		1110	435	152	610	61
hisztamin	L-dopa	1112	-	-	598	74
		1111	442	121	606	68
		1110	440	203	604	77
mbimdm	dopamin	1111	450	178	635	73
		1110	417	270	647	68
mbimdm	L-dopa	1112	455	186	623	97
		1111	450	120	636	72
		1110	434	255	648	74
mbimdm	glicin	1110	-	-	635	58

További összefüggések keresése érdekében a 9. táblázatban felsorolt származtatott képződési állandókat hasonlítottuk össze egymással. A táblázat az analóg réz(II)/cink(II)–hisztidin–dopamin/L-dopa illetve réz(II)/cink(II)–hisztamin–pirokatechol rendszerek megfelelő irodalmi értékeit is tartalmazza. A $\log K^\#$ értékek alapján elmondhatjuk, hogy a katecholaminok belépése az ML komplexbe ($ML + AH = MLAH$) jóval kedvezőbb a hisztamin esetében, mint a négyfogú ligandumoknál, ami érthető is, hiszen kevésbé telített a koordinációs szféra. A négyfogú imidazolszármazékok preferált koordinációs módja a négy nitrogén egy síkban történő koordinációja, a katecholaminok kötődésével azonban legalább egy nitrogénnek ki kell szorulnia az ekvatoriális síkból, ami axiálisan koordinálódhat újra. Jól ismert ugyanakkor, hogy a cink(II)-nél az axiális koordináció jóval kedvezményezettebb mint a réz(II)-nél. Ez magyarázatot adhat arra, hogy a cink(II) esetén a hisztamin valamint a 4N-es ligandumok $\log K^\#$ értékei között jóval kisebb a különbség, mint a réz(II) analóg értékei között. A 9. táblázat értékei alapján a 4N-es ligandumok beépülése az MAH összetételű komplexbe ($MAH + L = MLAH$, $\log K^\#$) mindkét fémion esetén nagyobb stabilitási állandóval írható le, mint a hisztamin koordinációja. Ez az eltérés viszonylag nagy (kb. három nagyságrend) a cink(II) komplexei esetén, ami összhangban van a hatos, $\{4N, 2O^-\}$ koordinációjú részecskék kialakulásával. A réz(II)-nél a hisztaminra és a két imidazolszármazékra számolt $\log K^\#$ értékek közötti különbség kisebb (kb. egy nagyságrend), de még mindig utóbbi ligandumok legalább háromfogú koordinációjára utal.

A terner komplexek pH 10 körül lejátszódó deprotonálódása jórészt a katecholaminok oldallánci aminocsoportjához rendelhető, hiszen az MLA komplexet eredményező deprotonálódás $pK^\#$ -i jó egyezést mutatnak a szabad ligandum hasonló értékével. Ugyanakkor, a spektrofotometriás mérések tanúsága szerint, utóbbi deprotonálódási folyamat jelentős spektrális változást eredményez (a d-d sáv maximuma nő, a töltésátviteli sáv pedig csökken), amit nem eredményezhet egy a koordinációs szférát nem érintő, attól meglehetősen nagy távolságban lejátszódó deprotonálódás. A spektrális változás szerkezeti átalakulásra utal, nevezetesen arra, hogy az ekvatoriális síkban koordinálódó nitrogéndonorcsoportok száma csökken, az oxigéndonoroké pedig nő. Az előbbieket alapján ez arra mutat, hogy a CuLAH komplex lehetséges izomerjei között olyan is előfordul, amelyben a katecholaminok axiális–ekvatoriális $\{O^-, O^-\}$ pozícióban kötődik a fémionhoz (ilyen izomerre az irodalomban is találhatunk példát [99]). Ugyanakkor az MLA terner komplexben a katecholaminok ekvatoriális $\{2N, 2O\}$ koordinációjú izomerje dominánsabbá válik.

9. táblázat *A vizsgált rendszerekben képződő vegyesligandumú komplexek származtatott képződési állandói ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,1\text{ M NaClO}_4$, * irodalmi adatok [99,100])*

$\log K^\#(\text{ML} + \text{AH} = \text{MLAH})$				$\log K^{\#\#}(\text{MAH} + \text{L} = \text{MLAH})$			
L	A	Cu(II)	Zn(II)	L	A	Cu(II)	Zn(II)
<i>L-His*</i>	<i>L-dopa</i>	12,73	9,27	<i>L-His*</i>	<i>L-dopa</i>	--	5,83
<i>L-His*</i>	<i>dopamin</i>	13,17	9,67	<i>L-His*</i>	<i>dopamin</i>	9,35	6,13
<i>hisztamin*</i>	<i>pirokatechol</i>	13,48	--	<i>hisztamin*</i>	<i>pirokatechol</i>	9,19	--
hisztamin	L-dopa	13,35	10,32	hisztamin	L-dopa	--	5,00
hisztamin	dopamin	13,43	10,09	hisztamin	dopamin	8,98	5,36
bimdm	L-dopa	7,29	7,43	bimdm	L-dopa	--	8,08
bimdm	dopamin	7,51	7,13	bimdm	dopamin	10,13	8,37
mbimdm	L-dopa	7,21	7,41	mbimdm	L-dopa	--	8,86
mbimdm	dopamin	6,57	7,17	mbimdm	dopamin	9,31	9,21
$\text{pK}^\#(\text{MLAH}_2 = \text{MLAH} + \text{H})$							
L	A	Cu(II)	Zn(II)	L	A	Cu(II)	Zn(II)
hisztamin	L-dopa	7,67	7,61	hisztamin	dopamin	--	--
bimdm	L-dopa	8,88	8,65	bimdm	dopamin	8,73	8,52
mbimdm	L-dopa	8,94	8,42	mbimdm	dopamin	8,66	7,81
$\text{pK}^{\#\#}(\text{MLAH} = \text{MLA} + \text{H}) \quad \text{pK}_{\text{NH}_3}(\text{L-dopa/dopamin}) = 9,82/10,33$							
L	A	Cu(II)	Zn(II)	L	A	Cu(II)	Zn(II)
hisztamin	L-dopa	9,84	9,68	hisztamin	dopamin	10,25	10,19
bimdm	L-dopa	9,61	9,76	bimdm	dopamin	10,02	10,24
mbimdm	L-dopa	10,13	9,89	mbimdm	dopamin	10,31	10,46

4.4. A hisztamin alegységet tartalmazó dhen réz(II)- és cink(II)komplexei

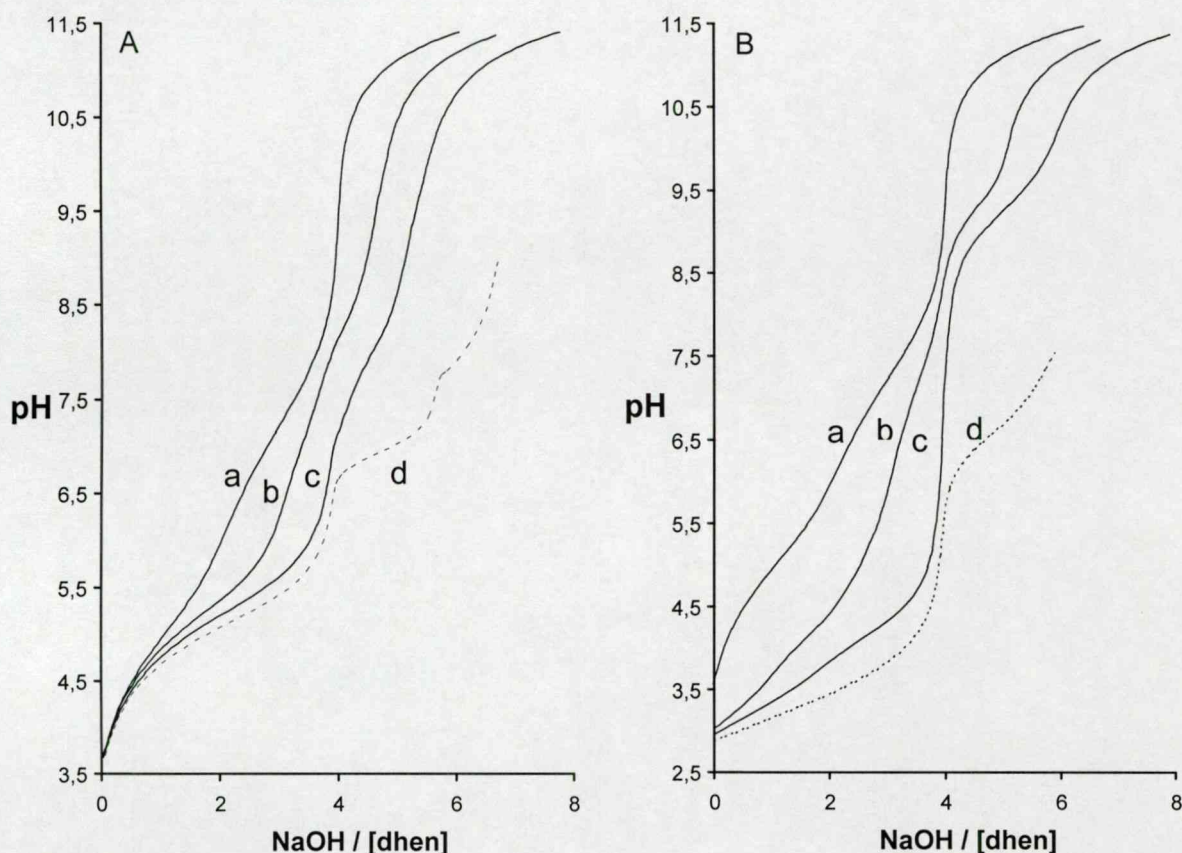
A hisztaminszerű donorcsoportokat tartalmazó, változatos koordinációs módokra lehetőséget biztosító dhen előállításával célunk olyan imidazoltartalmú peptid tanulmányozása volt, ahol a peptidkötés az élő szervezethez hasonlóan nem játszik szerepet a fiziológiás pH-tartományban. A dhen, valamint a hisztamin protonálódási állandóit és komplexeik képződési állandóit a 10. táblázat tartalmazza. A hisztamin esetén az általunk alkalmazott kísérleti feltételek mellett kapott eredmények jó egyezést mutatnak a korábbi vizsgálatokkal [102,103]. A dhen négy protonálható csoportot tartalmaz (két imidazol- és két aminocsoport), a primer aminocsoport nagyobb bázicitásának köszönhetően elsőként valószínűleg a két imidazolgyűrű fog deprotonálódni.

10. táblázat *A dhen és a hisztamin protonálódási állandói valamint réz(II)- illetve cink(II)ionokkal alkotott komplexeik képződési állandói*
($T = 298\text{ K}$ és $[363\text{ K}]$, $I = 0,1\text{ M NaCl}$, a becsült hibaértékek zárójelben)

dhen			hisztamin		
$M_pL_qH_s$	Cu(II)	Zn(II)	$M_pL_qH_s$	Cu(II)	Zn(II)
pK ₁	4,601(5) [3,67(5)]		011	6,081(2) [4,85(5)]	
pK ₂	5,356(5) [4,36(5)]		012	9,763(1) [7,94(5)]	
pK ₃	6,787(4) [5,57 (5)]		---		---
pK ₄	7,773(4) [6,31(5)]		---		---
112	20,81(1)	---	111	12,85(3)	10,87(4) [---]
111	16,77(1)	12,33(1) [11,0(1)]	110	9,48(1)	5,15(1) [4,5(1)]
220	27,83(2)	16,47(2) [15,0(1)]	121	21,48(3)	---
42-4	16,29(4)	-2,29(6) [1,3(1)]	120	15,98(1)	9,97(1) [8,6(1)]
42-5	---	-11,56(9) [-5,3(1)]	11-1	---	-3,04(2) [-2,0(1)]
42-6	---	-21,15(9) [-12,2(1)]	12-1	5,19(1)	---
11-2	-6,12(1)	-11,77(5) [-8,8(1)]	22-2	7,02(1)	---
N. P.	579	462 [218]	N. P.	721	391 [326]
F. P.	0,006	0,007 [0,013]	F. P.	0,006	0,005 [0,008]

N. P. = kísérleti pontok száma, F. P. = illesztési paraméter (cm³)

Az imidazolesoportok a szubsztituátlan imidazolgyűrű ($pK = 6,95$ [104]) és a hisztamin imidazolgyűrűjének pK -jához ($pK = 6,081$) képest jóval alacsonyabb pH-n deprotonálódnak ($pK_1 = 4,601$; $pK_2 = 5,356$), mivel a ligandum teljesen protonált formájában négy pozitív töltésű, így a deprotonálódás kedvezményezett. Az aminocsoportok bázicitása is kisebb az imidazolgyűrűk elektronszívó hatása miatt ($pK_3 = 6,787$; $pK_4 = 7,773$), mint az analóg N,N'-digliciletán-1,2-diamin esetén ($pK = 7,48$ és $8,22$ [105]). Ha egy molekula két azonos deprotonálódó csoportot azonos környezetben tartalmaz és ezek között nincs számottevő kölcsönhatás (például térben távol helyezkednek el egymástól), akkor statisztikai megfontolások alapján [106] ezek pK értékeinek különbsége $0,6$ ($\Delta pK = \log 4$). A dhen imidazolesoportjai esetén ez az érték $0,76$, vagyis valószínűleg nincs kölcsönhatás közöttük. Az aminocsoportok ΔpK -ja $0,99$, viszont az analóg N,N'-digliciletán-1,2-diamin esetén $0,74$. Ez a különbség azt mutatja, hogy a dhen aminocsoportjainak deprotonálódása nem teljesen független egymástól. A dhen különböző fém–ligandum arányoknál kapott titrálási görbéit az 34. ábra mutatja.



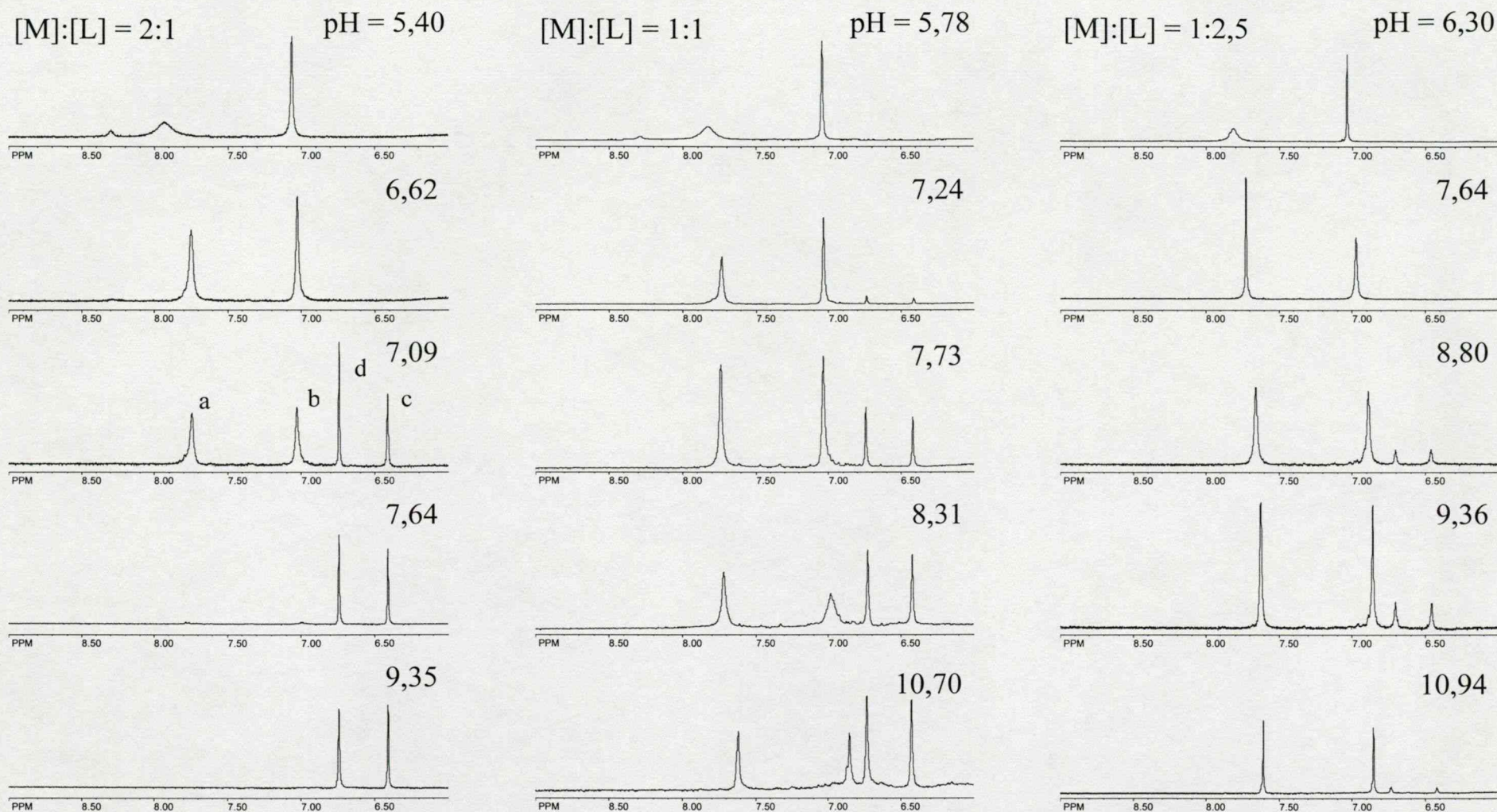
34. ábra A cink(II)–dhen (A) és a réz(II)–dhen (B) rendszerek titrálási görbéi

különböző fém–ligandum arányoknál;

$[L] = 0,0028\text{ M}$ (a) és $[M] = 0,0014$ (b), $0,0026$ (c) illetve $0,0052\text{ M}$ (d)

Jól látható, hogy a ligandum deprotonálódása a fémkoordináció hatására alacsonyabb pH-kon játszódik le. A komplexképződés, mint az várható volt, jóval alacsonyabb pH-kon indul meg a réz(II)tartalmú rendszerben, mint a cink(II)-nél. A cink(II)-dhen rendszerben pH = 7 fölött újabb deprotonálódás történik, melynek során pH = 11-ig a fémre nézve két ekvivalens proton válik szabaddá. A fémfelesleget tartalmazó rendszerben érdekes módon pH = 9-ig két extra deprotonálódás figyelhető meg, magasabb pH-kon pedig megindul a csapadékkiválás. Ezen 2:1 fém–ligandum aránynál végzett méréseinket a titrálások során tapasztalt lassan beálló egyensúlyok miatt nem használtuk fel a képződési állandók számításához. Az ekvimoláris és a ligandumfelesleget tartalmazó titrálási görbéink is többféle modellel illeszthetők, így ebben az esetben mint független módszert, az NMR-t vettük igénybe a rendszer pontos leírásához. A réz(II)tartalmú rendszerben 2:1 fém–ligandum aránynál már pH 7,5 fölött csapadékképződést tapasztaltunk és a cink(II)-hez hasonlóan kinetikai okok miatt nem értékeltük ezen titrálásokat. Az ekvimoláris és a ligandumfelesleg mellett végzett méréseinknél a cink(II)-kel összehasonlítva az extra deprotonálódás kb. egy egységgel magasabb pH-n játszódik le, a rendszerben képződött komplexekről UV-látható, CD- és ESR-vizsgálatokkal gyűjtöttünk további információkat.

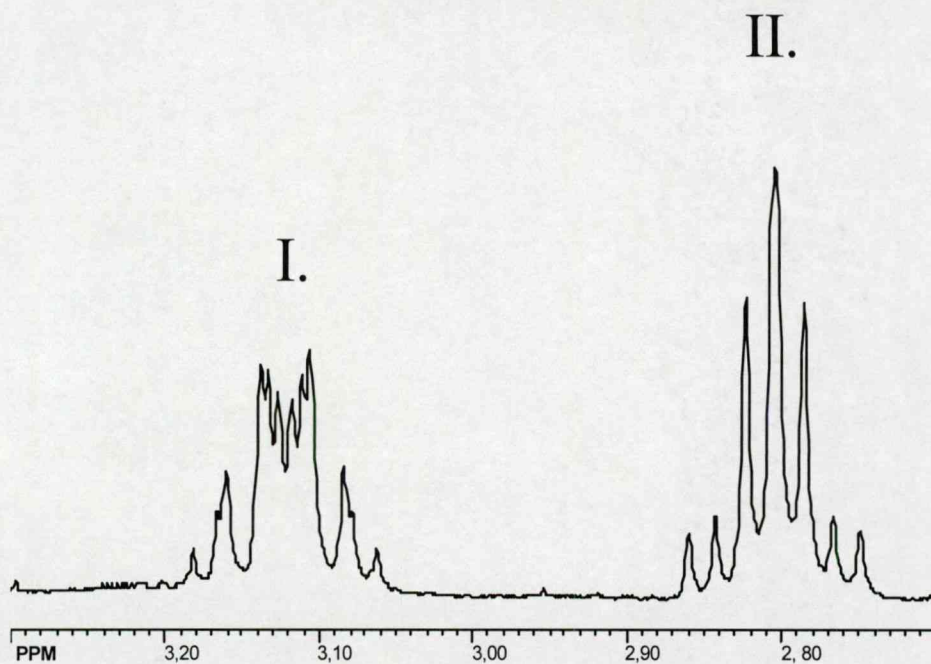
Az 35. ábra a különböző fém–ligandum arányoknál felvett NMR-spektrumok imidazolprotonjainak pH-függését mutatja. A jelek eltolódása illetve kiszélesedése a szabad ligandumhoz képest már pH 5-nél fém–ligandum kölcsönhatásra utal. Minthogy a C² proton kiszélesedése jelentősebb, ezért a kialakuló komplexekben az imidazolgyűrű N³-as nitrogénjének koordinációja valószínűsíthető. A fémfelesleget tartalmazó 2:1 rendszerben pH 6,6 felett fokozatosan egy új jelcsoport jelenik meg az előzőekhez képest jelentősen eltolódva a nagyobb terek irányába, amely egy lassú ligandumcserével bíró komplex kialakulásához rendelhető. Mivel nem tapasztaltunk csapadékképződést, ezért ez a megfigyelés csak olyan komplex(ek) kialakulásával magyarázható, amelyben 2:1 a fém–ligandum arány. Az 1:1 és az 1:2 rendszerekben is megjelenik a lassú ligandumcserével bíró komplex, amely széles pH-tartományban – ott, ahol több deprotonálódás is lejátszódik – végig jelen van. Az ekvimoláris rendszerben pH = 8-11 között körülbelül azonos a jelek intenzitása, azaz itt is nagy mennyiségben képződik a 2:1 komplex. Ligandumfelesleg mellett (1:2,5 aránynál) magasabb pH-kon csökken a lassú ligandumcseréjű komplex jelének intenzitása, vagyis újabb komplex(ek) alakulnak ki. Felmerül a kérdés, mi lehet ezen többmagvú komplex vagy komplexek szerkezete.



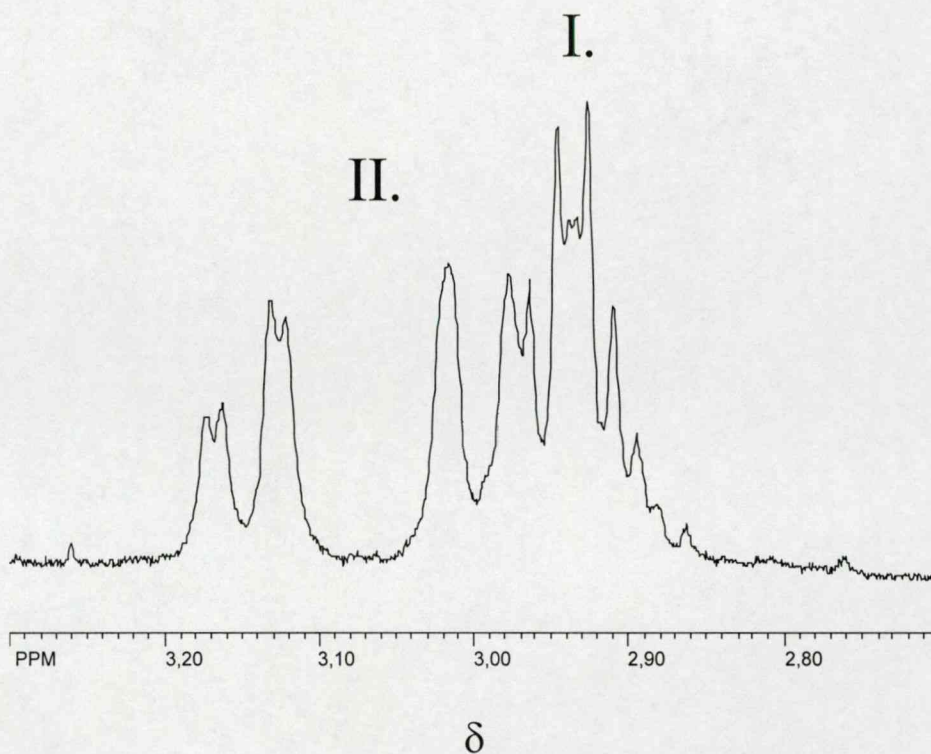
35. ábra A cink(II)-dhen rendszerben különböző fém–ligandum arányánál felvett NMR-spektrumok imidazolprotonjainak pH-függése (C^2 és C^5 protonok jeleit 'a' és 'b'-vel jelöltük gyors ligandumcsere illetve 'c' és 'd'-vel lassú ligandumcsere sebesség esetén)

A pH 6 felett lejátszódó lúgfogyasztó folyamatok vagy a koordinált víz deprotonálódásához, vagy a fémion által indukált amidnitrogén deprotonálódásához, vagy pedig az imidazolgyűrű pirrolos (N^1 -es) nitrogénjének deprotonálódásához rendelhetők. Ennek kapcsán említést érdemel a lassú ligandumcserével bíró komplex imidazolprotonjainak jelentős eltolódása, főként a C^2 szénen lévő proton, amely 1,4 ppm eltolódást szenved a szabad ligandumhoz képest (a C^5 szénen lévő proton eltolódása csak 0,3 ppm). Ugyanakkor az etiléndiamin-rész metilén protonjai (melyek közvetlenül kapcsolódnak az amidnitrogénekhez) nem mutatnak nagy mértékű változást a komplexképződés során. A fémionhoz koordinált víz deprotonálódásával létrejövő vegyes hidroxokomplex kialakulása sem eredményezheti az imidazolprotonok jeleinek ilyen nagy mértékű eltolódását. Az irodalomban több hisztidintartalmú peptid cink(II)- és diamágneses nikkell(II)komplexénél is beszámolni peptidnitrogén deprotonálódása során kialakuló lassú ligandumcseréjű komplexekről [35,107], azonban ezeknél az amid környezetében lévő protonok jóval nagyobb, az imidazolprotonok jóval kisebb eltolódást szenvednek. Ugyanakkor az irodalomban több esetben is találkozhatunk az imidazolgyűrű protonjainak ezzel teljesen analóg eltolódásával diamágneses nikkell(II)komplexek esetén, ahol ez az imidazol N^1 -es nitrogénjének deprotonálódásához volt rendelhető [35,36], így ez esetünkben is erősen valószínűsíthető. Ennek eredményeképpen a pirrolos nitrogén deprotonálódásával létrejövő imidazolátanion kétfogú hídligandumként koordinálódik a létrejövő komplex(ek)ben. Erre utal a hisztidinegység metilénjeleinek a megváltozása is a szabad ligandumhoz képest (36. ábra). A $C^{\beta}H_2$ csoport protonjainak inekvivalenciája jelentősen megnő a komplexben, ami az imidazolgyűrű erősen rögzített állapotára utal, s ez összecseng azzal, hogy a gyűrű kétfogú hídként kötődik. Mivel az NMR-spektrumban csak egyetlen jel jelenik meg a ligandum minden egyes protonját tekintve, ezért az imidazolgyűrűk a létrejövő komplex(ek)ben azonos környezetben helyezkednek el és ezt – a ligandumszerkezetből következően – csak 2:1 fém–ligandum aránnyal rendelkező ciklikus oligomer képződésével magyarázhatjuk, ahol a fémionokat kétfogúként koordinálódó imidazoláthidak kötik össze. A cink(II)–dhen rendszerben valószínűleg a legkisebb méretű, azaz 4:2 fém–ligandum aránnyal bíró ciklikus oligomer komplex alakul ki, melyhez hasonló szerkezetű, négymagvú komplexek vizsgálatára számos példát találunk az irodalomban [34,35,108,109], de nem zárható ki nagyobb méretű oligomerek képződése sem. Ezen ismeretek birtokában egyensúlyi méréseink a 37. ábrán látható eloszlásgörbékkel írhatók le az ekvimoláris rendszerben illetve ligandumfelesleg alkalmazása mellett.

a.

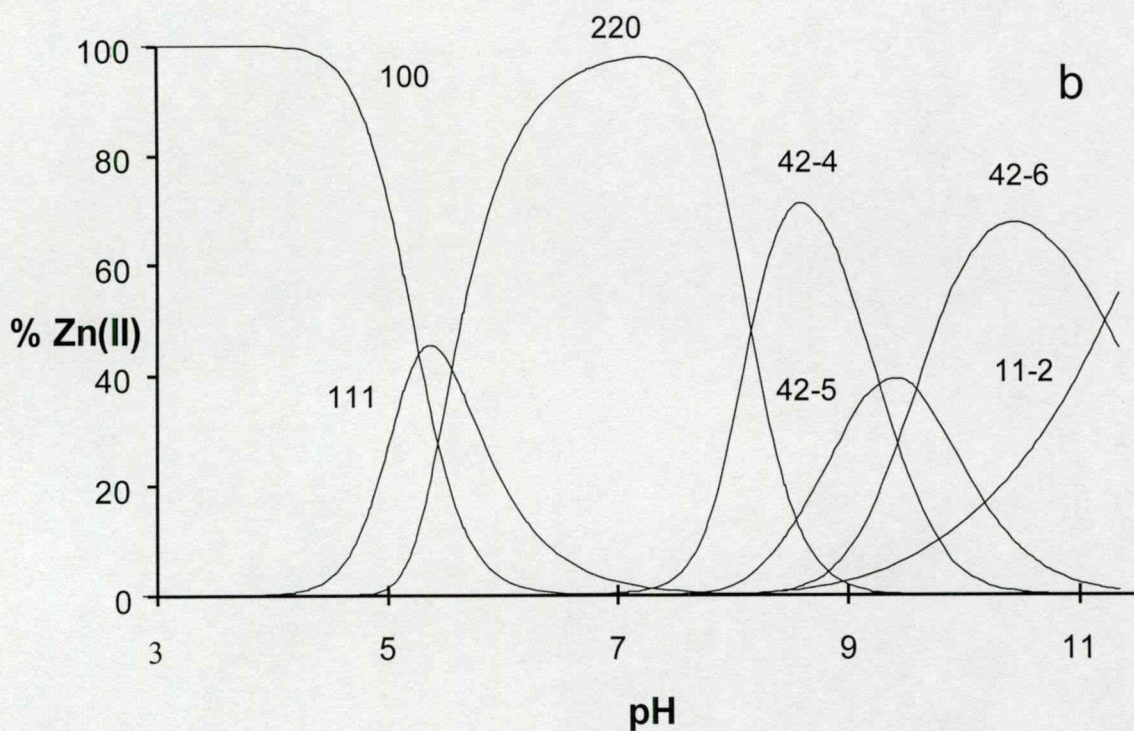
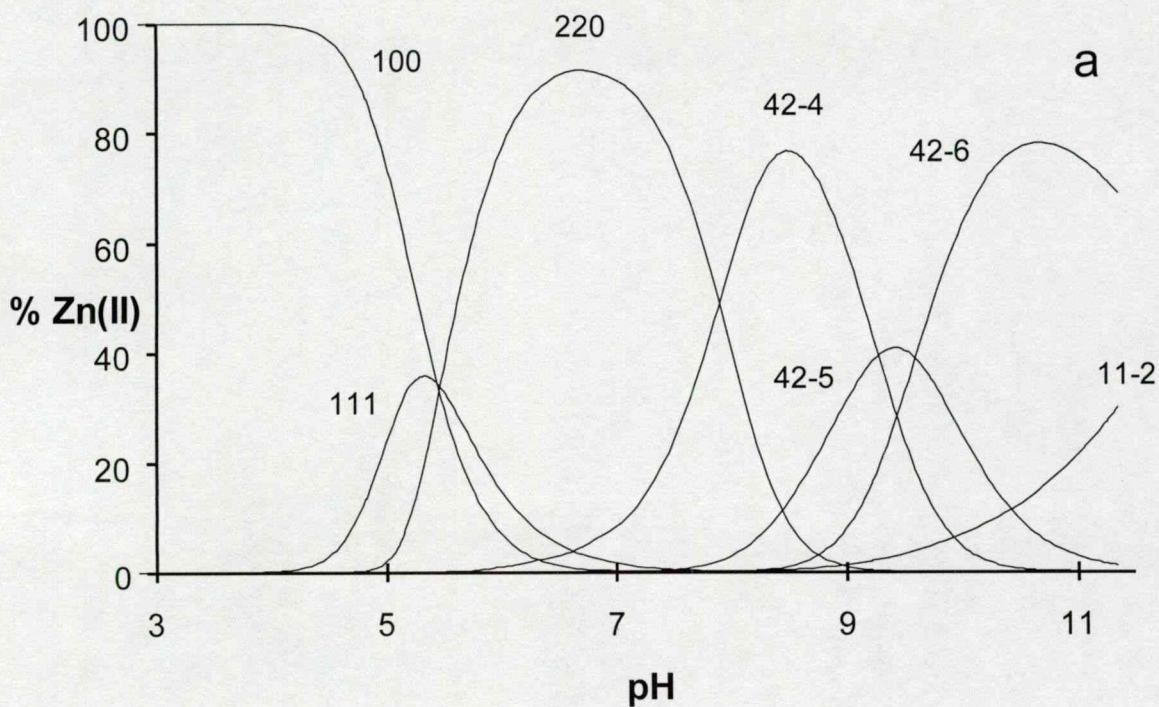


b.



36. ábra A dhen metilén protonjainak [etiléndiamin-(I) és hisztidilrész(II)] ^1H -NMR spektruma a szabad ligandumban $\text{pH}=10,5$ -nél (a) illetve a cink(II)–dhen 2:1 rendszerben $\text{pH}=9,35$ -nél (b)

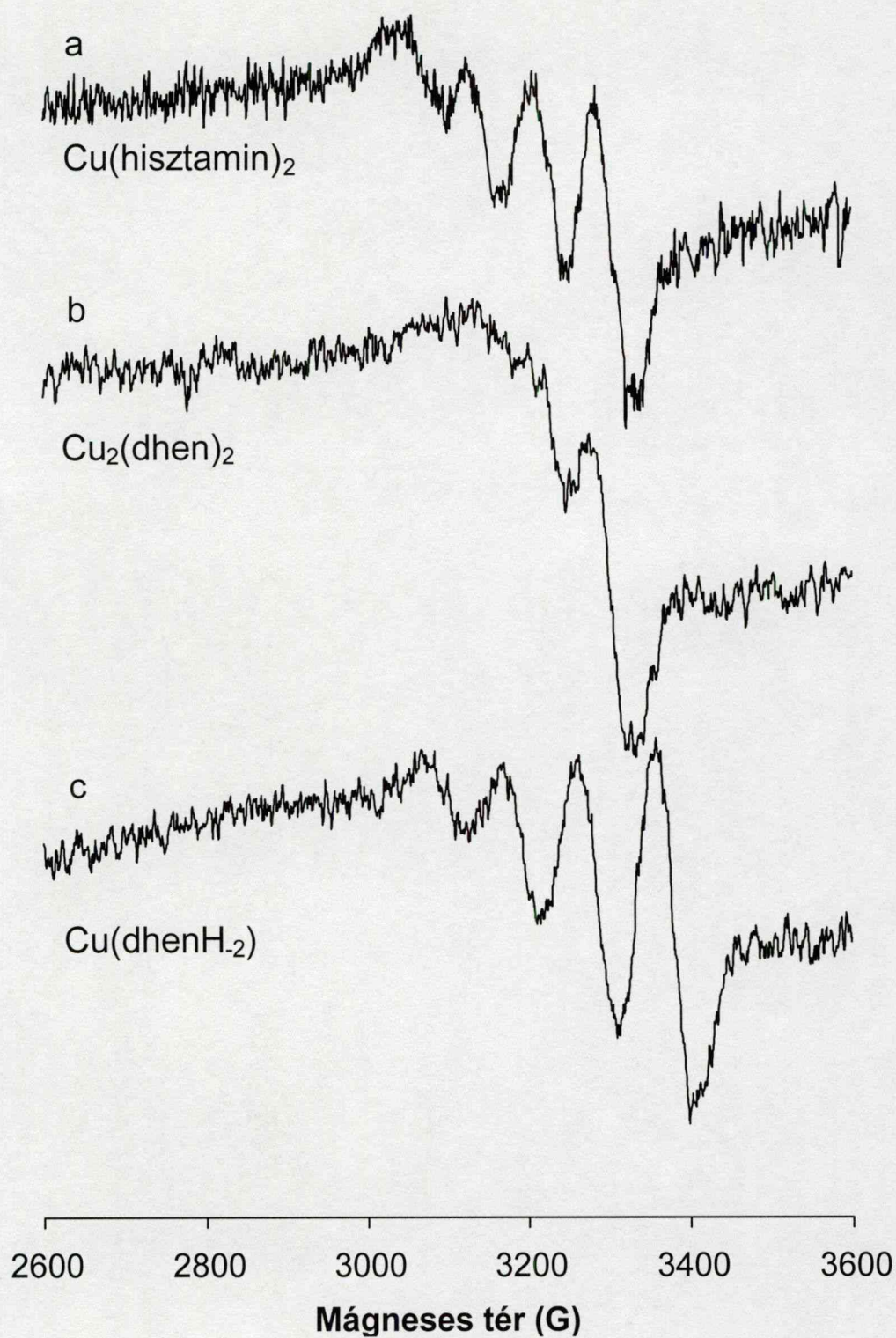
Alacsonyabb pH-kon MLH összetételű részecske alakul ki, majd a pH növelésével közel 100 %-ban van jelen a Zn_2L_2 komplex. Ebben a {4N} koordinációjú komplexben a fémionhoz két aminonitrogén és két N^3 -as imidazolnitrogén kapcsolódik. A semleges pH-tartományban képződő komplex a pH-metria illetve az NMR-mérések alapján ML illetve M_2L_2 összetételű is lehet, azonban a réz(II)-dhen rendszerben kapott eredmények és a kinetikai mérések alapján (ld. 4.4.1. fejezet) a dimer komplex kialakulását valószínűsíthetjük. A pH további növelésével az 1:1 rendszer esetén pH 7, az 1:2-es rendszerben pH 8 körül indul el a négymagvú ciklikus oligomer komplex ($\text{Zn}_4\text{L}_2\text{H}_4$) képződése, amely az NMR-mérések alapján széles pH-tartományban jelen van. A potenciometriás mérések ezen komplex képződési tartományában további deprotonálódási folyamatokra utalnak, ami csak vegyes hidroxokomplexek képződésével magyarázható. A lúgos pH-tartományban egymagvú, ZnLH_2 összetételű részecske alakul ki, amelyben az NMR-mérések alapján (gyors ligandumcsere sebesség) valószínűbb a koordinált víz deprotonálódása, mintsem a peptidnitrogéné. A réz(II)-dhen rendszerben a pH-metriás és spektroszkópiás mérések alapján 1:1 és 1:2 fém-ligandum aránynál széles pH-tartományban (pH 5–8 között) egyetlen domináns részecske van jelen, amely mint arról már a cink(II)-nél is szó esett, ML illetve M_2L_2 összetételű is lehet. A d-d átmenet maximuma ($\lambda = 625 \text{ nm}$) ezen komplex esetén jóval magasabb hullámhossznál jelenik meg, mint amit négy nitrogén koordinációnál várnánk (pl. a hisztamin {2NH₂, 2N_{im}} koordinációjú bisz-komplexének abszorpciós maximuma 600 nm). Az irodalomban azonban találhatunk példát a vizsgált komplexünkhöz nagyon hasonló értékre is, hiszen a His-Gly bisz-hisztamin jellegű koordinációval bíró CuL_2 komplexe 630 nm-nél jelentkező d-d átmenettel rendelkezik [94]. A vizsgált részecske ESR-paraméterei ($g_0 = 2,101$, $A_0 = 68 \text{ G}$, $g_{||} = 2,238$, $g_{\perp} = 2,057$, $A_{||} = 180 \text{ G}$) már egyértelműen négy nitrogén koordinációra utalnak, hiszen a hisztamin bisz-komplexe ($g_0 = 2,110$, $A_0 = 76 \text{ G}$, 38. ábra) és a His-Gly CuL_2 összetételű komplexe ($g_{||} = 2,247$, $g_{\perp} = 2,044$, $A_{||} = 186 \text{ G}$ [95]) is hasonló értékeket mutat. Ugyanakkor ha egymagvú Cu(dhen) komplex képződne, annak mérete és szerkezete teljesen analóg lenne a $\text{Cu}(\text{hisztamin})_2$ komplexszel, emiatt viszont nem lenne értelmezhető a két ESR-spektrum (38. ábra) közötti igen jelentős vonalszélességbeli különbség. Ezen spektrumok sokkal inkább azt bizonyítják, hogy jelentős méretbeli különbség van a két komplex között, ami a kétmagvú Cu_2L_2 (39. ábra) összetételű komplex kialakulását valószínűsíti. A hipotetikus ML komplexben tizenegytagú kelátgyűrű alakulna ki a két aminocsoport között, ami úgy tűnik nem stabilizálja ezen komplexet.



37. ábra A cink(II)–dhen rendszer eloszlásgörbéi

1.1 $[Zn] = [L] = 0,003 \text{ M}$ (a) illetve 1,05 $[Zn] = 0,5 [L] = 0,0015 \text{ M}$ (b)

($T = 298 \text{ K}$, $I = 0,1 \text{ M NaCl}$)



38. ábra Szobahőmérsékletű ESR-spektrumok

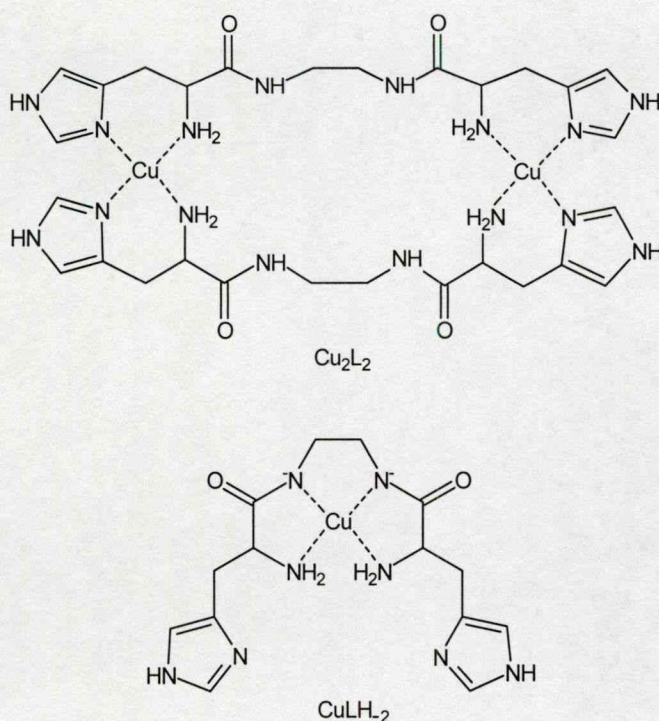
a réz(II)–hisztamin(a) és a réz(II)–dhen (b,c) rendszerekben

$[\text{Cu}] = 0,004 \text{ M}$; $[\text{Cu}]:[\text{L}] = 1:5$ (a), $1:1$ (b,c); pH 8,0 (a), 7,5 (b), 11,0 (c)

A réz(II)–dhen 1:1 és 1:2 rendszerek CD-spektrumainak pH-függése alapján pH 6 körül 100 %-ban kialakul egy részecske mindkét rendszerben, amely az előzőek alapján Cu_2L_2 összetételű. Ugyanakkor pH 7-10 között (40. ábra) a két rendszer viselkedése alapvetően eltér egymástól, az ekvimoláris oldatban újabb részecske(k) jelenik meg viszonylag nagy koncentrációban, amelyből ligandumfelesleg mellett jóval kevesebb képződik. A CD-spektrumok mátrixrang analízise alapján [110] ebben a köztes pH-tartományban ellentétben a cink(II)tartalmú rendszerrel csak egyetlen komplex alakul ki, amely az előzőek és a pH-metriás adatok figyelembevételével nagy valószínűséggel 2:1 összetételű, hiszen az 1:1 és 1:2 rendszerek ilyen nagymértékű különbsége 1:1 vagy 1:2 fém–ligandum aránnyal rendelkező komplex képződésével nem magyarázható. Emellett többmagvú komplex képződésére utal a fémcentrumok közötti antiferromágneses kölcsönhatás következtében létrejövő intenzitáscsökkenés is az ESR-spektrumon. Ezen többmagvú komplex összetételére vonatkozóan megállapítható, hogy míg a pH-metriás görbék az ugyanolyan protonáltsági állapotú Cu_2LH_2 illetve $\text{Cu}_4\text{L}_2\text{H}_4$ összetételű komplex feltételezésével is hasonlóan illeszthetők, ezzel szemben a CD-spektrumok csak a négymagvú részecskével vagy ennek nagyobb tagszámú analógjával írhatók le megfelelő módon. Az előbbieket alapján tehát ebben a köztes pH-tartományban a cink(II)tartalmú rendszerhez hasonlóan négymagvú komplex kialakulása valószínűsíthető. A lúgos pH-tartományban pedig újra ugyanaz a domináns részecske van jelen az 1:1 és 1:2 rendszerekben, amely a pH-metriás mérések alapján CuLH_2 összetételű. A d-d átmenet maximuma ($\lambda = 514 \text{ nm}$) és az ESR-paraméterek alapján ($g_0 = 2,080$, $A_0 = 90,4 \text{ G}$, 38. ábra; $g_{||} = 2,178$, $g_{\perp} = 2,046$, $A_{||} = 206,6 \text{ G}$) egyértelmű, hogy a CuLH_2 komplexben a két peptidnitrogén deprotonálódik, miközben az imidazolnitrogének kiszorulnak a koordinációs szférából (39. ábra).

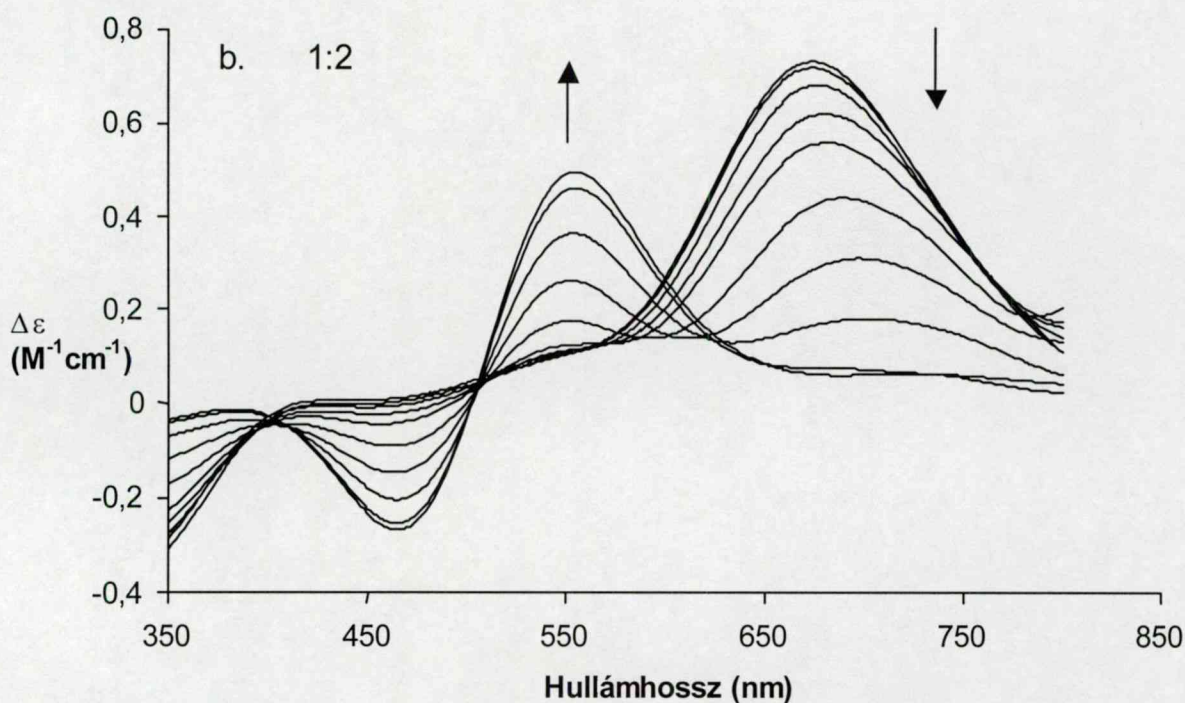
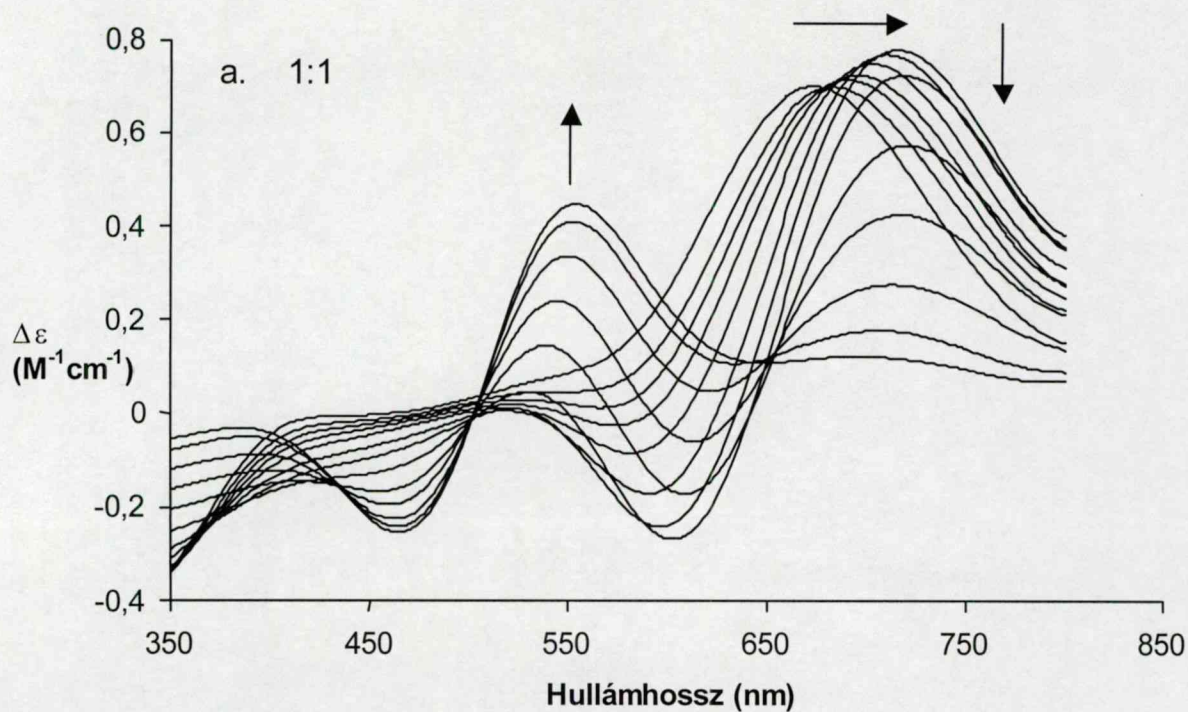
Ezen eredmények alapján az 41. ábrán látható eloszlásgörbék vonatkoznak az 1:1 és 1:2 rendszerekre. A savas pH-tartományban kettő illetve három nitrogén koordinálódásával MLH_2 illetve MLH összetételű protonált részecskék keletkeznek. A cink(II)-nél is javasolt kétmagvú, bisz-hisztamin koordinációval bíró komplex igen széles pH-tartományban (pH 5-8 között) domináns. Érdeemes megjegyezni, hogy az $\text{M}(\text{hisztamin})_2$ komplexek bázicitással korrigált képződési állandói (például a CuL_2 esetén $\log \beta_{120,\text{kor}} = \log \beta_{120} - 2\log \beta_{012} = -15,71$) több nagyságrenddel alacsonyabbak, mint más hisztaminszerű ligandumok, így a HisOMe ($\log \beta_{120,\text{kor}} = -11,92$) [111], a His-Gly ($\log \beta_{120,\text{kor}} = -11,61$) [94] illetve a vizsgált dhen $\{\log[(\beta_{220,\text{kor}})^{1/2}] = (\log \beta_{220} - 2\log \beta_{014})^{1/2} = -12,01\}$ esetén. Ez esetleg utalhat arra, hogy az utóbbi vegyületek esetén a karbonil oxigén axiális koordinációja valósul meg, ami stabilizálja

a szerkezetet és emellett magyarázatot adhat az ezen vegyületek réz(II)komplexeinél tapasztalt vörös eltolódásra is. Az általunk vizsgált rendszerben igen széles pH-tartományban jelenlévő kétmagvú komplex hisztaminszerű koordinációja rendkívül stabil, s ennek köszönhetően az amidnitrogén a réznél szokásosnál jóval magasabb pH-n deprotonálódik (például az analóg N,N'-digliciletán-1,2-diamin esetén [105] a deprotonálódás két logaritmus egységgel alacsonyabb pH-n játszódik le). Mivel mindkét fémion esetén a deprotonálódási folyamat ($M_2L_2 \rightarrow 2 MLH_2 + 4 H^+$) logK-ja majdnem azonos ($\log K_{Zn(II)-dhen} = -40,01$ illetve $\log K_{Cu(II)-dhen} = -40,07$), ezért figyelembe véve a cink(II) jóval kisebb affinitását az amidcsoporthoz, a két közel egyező érték különböző deprotonálódási folyamatot takar. A réz(II)-nél az amidnitrogén, míg a cink(II) esetén a koordinált víz deprotonálódása a valószínűbb.



39. ábra A réz(II)–dhen rendszerben képződő komplexek vázlatos szerkezete

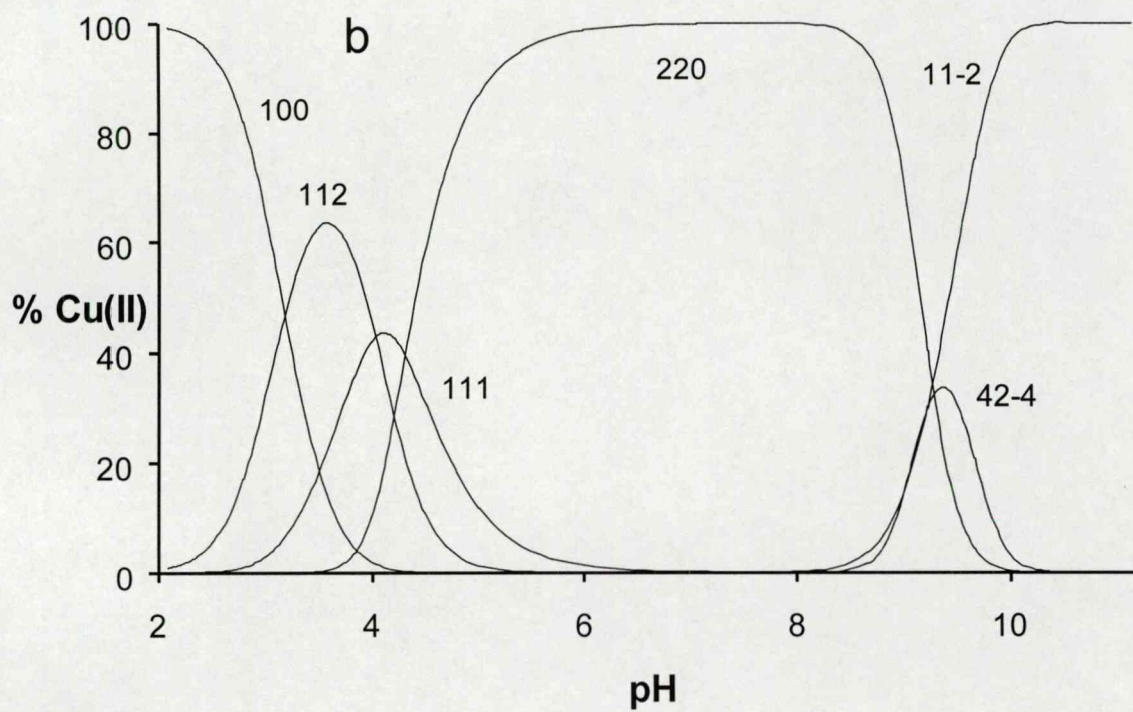
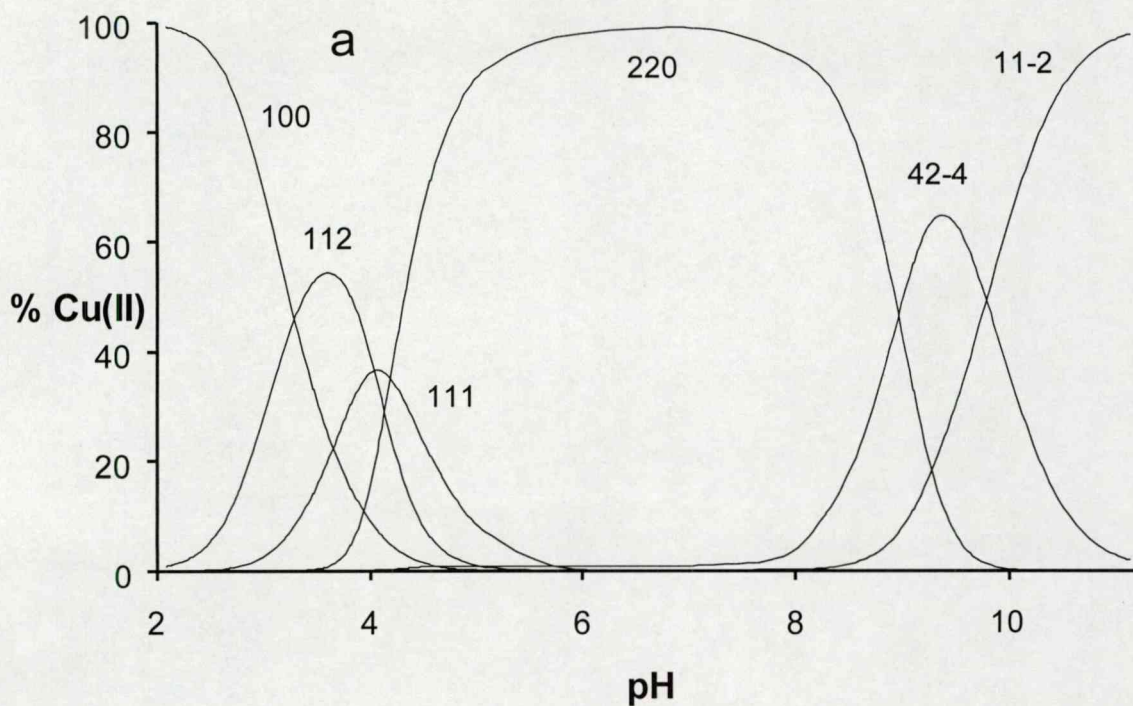
A kinetikai mérések pontosabb leírása érdekében a cink(II)–dhen és a cink(II)–hisztamin rendszerek potenciometriás vizsgálatát 90°C-on is elvégeztük. A mérések kiértékelése során ugyanazon részecskék képződését feltételeztük, mint 25°C-on, a meghatározott képződési állandókat a 10. táblázat tartalmazza. A cink(II)ion hidrolízisének tanulmányozása során (0,001–0,004 M $Zn(ClO_4)_2$ -oldatot titráltunk 90°C-on a csapadékképződés megindulásáig, vagyis a $Zn(OH)$ részecske 10–15%-os képződéséig) meghatároztuk a kinetikai mérések kiértékeléséhez szükséges $Zn(OH)$ részecske képződési állandóját $\{\log \beta_{10-1} = -6,8(2)\}$ is.



40. ábra CD-spektrumok a réz(II)–dhen 1:1 (a) és 1:2 (b) rendszerekben

a. $[Cu] = [L] = 0,0025\text{ M}$; pH 7,43, 8,12, 8,37, 8,58, 8,80, 9,01, 9,18, 9,41, 9,68, 9,87, 10,12, 10,37 és 10,57 (650 nm-nél fentről lefelé)

b. $[Cu] = 0,5[L] = 0,0015\text{ M}$; pH 7,55, 8,23, 8,61, 8,85, 9,01, 9,25, 9,44, 9,66, 10,04 és 10,46



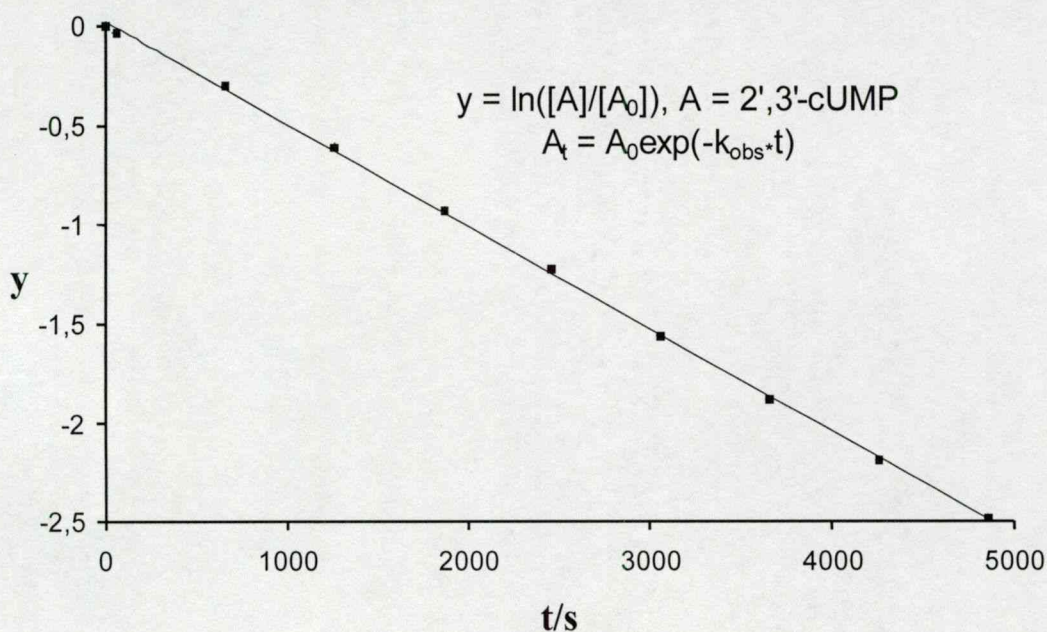
41. ábra A réz(II)–dhen rendszer eloszlásgörbéi

$[Cu] = [L] = 0,003 \text{ M}$ (a) illetve $[Cu] = 0,5[L] = 0,0015 \text{ M}$ (b)

($T = 298 \text{ K}$, $I = 0,1 \text{ M NaCl}$)

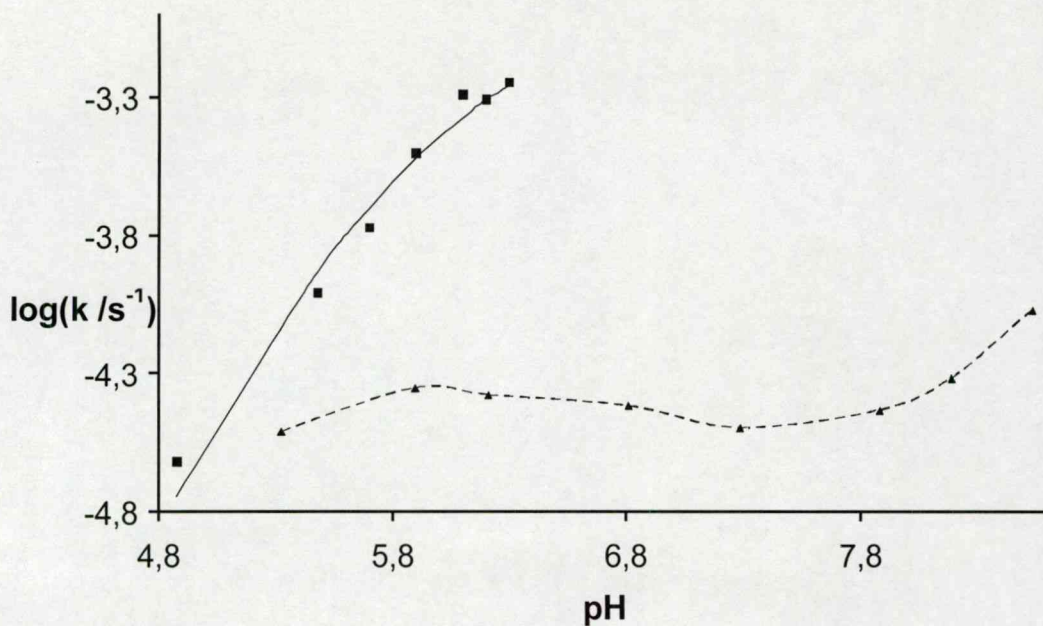
4.4.1. A cink(II)komplexek hidrolitikus aktivitásának vizsgálata nemaktivált foszfátészterek segítségével

A célkitűzéseknek megfelelően a hisztamin és a dhen cink(II)komplexeinek hidrolitikus aktivitását a nemaktivált 2',3'-cUMP segítségével, HPLC-technikával tanulmányoztuk (ld. 3.2.3. fejezet). A méréseket az elővizsgálatok alapján 90°C-on hajtottuk végre. A 2',3'-cUMP koncentrációjának csökkenése az idő függvényében ábrázolva egyenest ad (42. ábra), az egyenes meredekségéből egy pszeudo elsőrendű sebességi állandó számítható, melyeknek pH-függését a 43. ábra mutatja. A cink(II)–hisztamin rendszer hidrolitikus aktivitása erőteljesen növekszik a pH-val az $\{N_{im}, NH_2, OH^-\}$ koordinációval bíró $ZnLH_1$ összetételű komplex kialakulásával párhuzamosan (44. ábra). A ligandumfelesleg növekedésével az aktivitás jelentősen lecsökken (45.A ábra), ami arra utal, hogy a szintén képződő és egyre jobban túlsúlyba kerülő ZnL_2 komplexnek nincs hatása a hidrolízisre. Ezek a tapasztalatok is arra a korábbi megfigyelésre utalnak, hogy a fémhez kötött hidroxidion jelenléte meghatározó a hidrolízisben. Az összkoncentrációtól való függést ebben a rendszerben 6,3-as pH-n vizsgáltuk (45.B ábra). Mivel az alkalmazott feltételek mellett több részecske van egyensúlyban, ezért sem a reakciórendre, sem a katalízis esetleges előegyensúlyi folyamataira nem lehet következtetni. Az irodalmi eredmények figyelembevételével [65,67,109] azonban egyértelműnek látszik egy cinket és egy foszfátot 1:1 arányban tartalmazó vegyesligandumú komplex kialakulása.

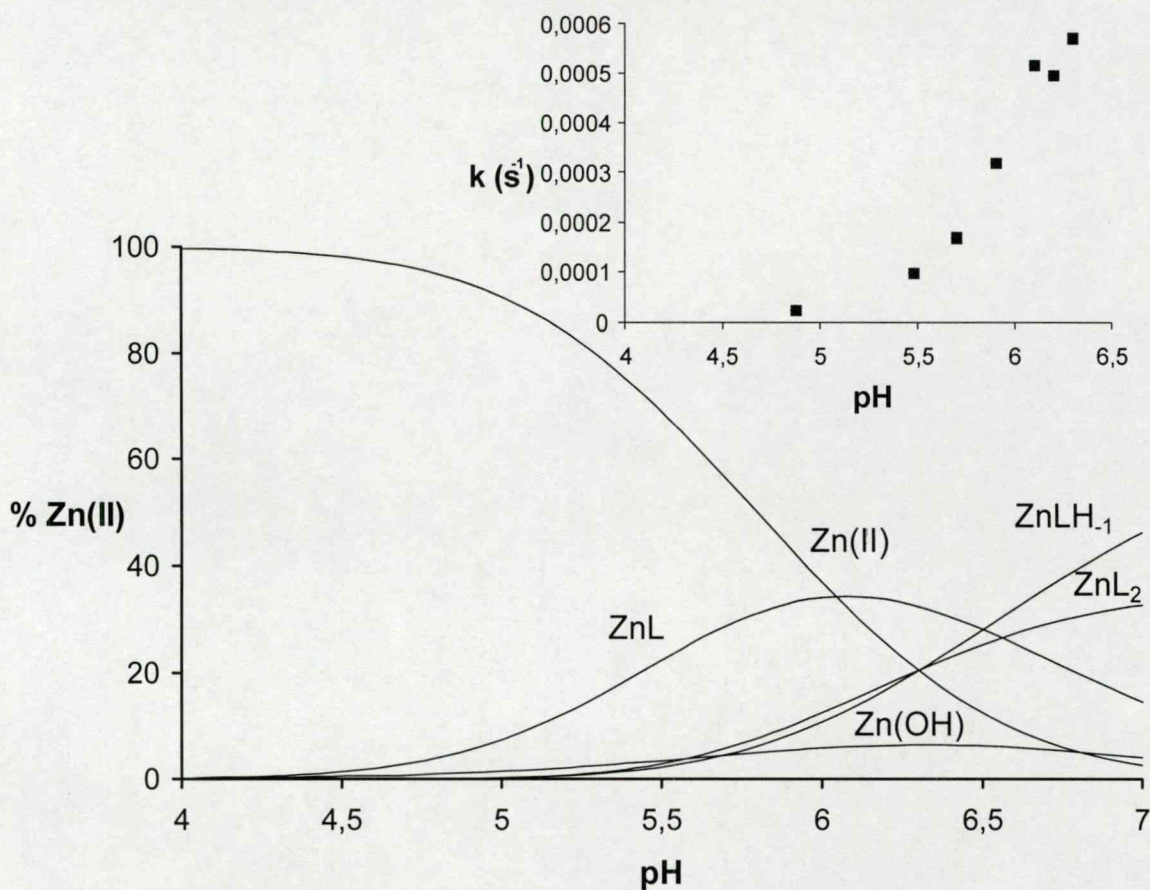


42. ábra A 2',3'-cUMP hidrolízisének folyamata 90 °C-on

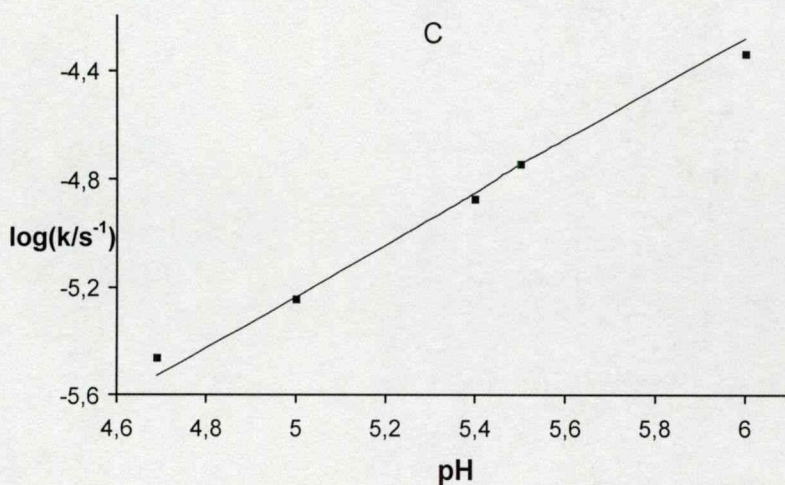
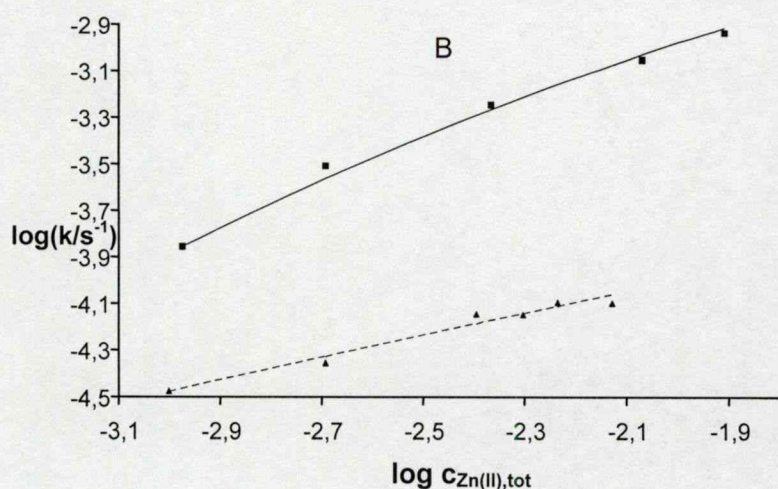
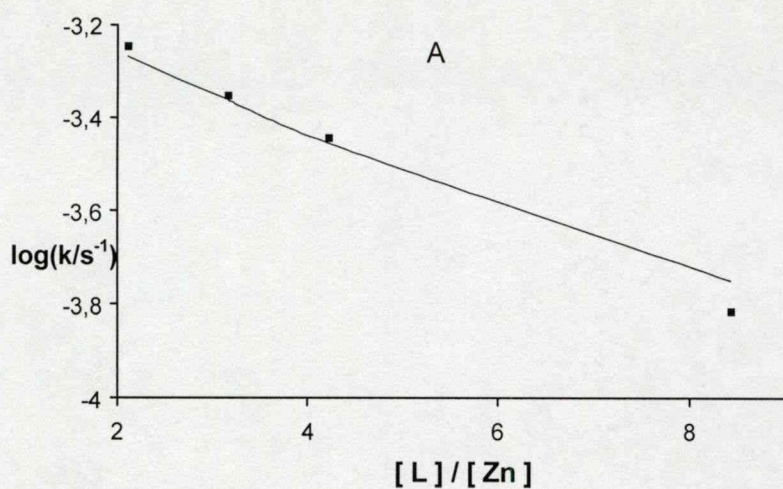
($[Zn] = 0,45[hisztamin] = 0,004\text{ M}$, $[2',3'\text{-cUMP}]_0 = 0,0005\text{ M}$)



43. ábra A pseudo elsőrendű sebességi állandó pH-függése a cink(II)–hisztamin (■, $[Zn] = 0,45$ $[L] = 0,004$ M) és a cink(II)–dhen (▲, $[Zn] = 0,95$ $[L] = 0,002$ M) rendszerekben (A folytonos vonal illesztett görbe; $T = 363$ K, $I = 0,1$ M NaCl)



44. ábra Részecskeeloszlás a cink(II)–hisztamin rendszerben ($[Zn] = 0,45$ $[L] = 0,004$ M) valamint az előző ábra ugyanezen rendszerre vonatkozó értékei nem logaritmikus ábrázolásban ($T = 363$ K)



45. ábra *A* pszeudo elsőrendű sebességi állandó függése

A a ligandum–fém aránytól a cink(II)–hisztamin ($[Zn] = 0,45[L]$; $pH = 6,3$)

B az összes fémionkoncentrációtól a cink(II)–hisztamin (■, $[Zn] = 0,45[L]$; $pH = 6,3$)

és a cink(II)–dhen (▲, $[Zn] = 0,95[L]$; $pH = 5,9$) rendszerekben, valamint

C a pH-tól a csak cink(II)iont tartalmazó rendszerben [112]

(*A* folytonos vonal illesztett görbe; $[Zn] = 0,004\text{ M}$, $T = 363\text{ K}$, $I = 0,1\text{ M NaCl}$)

A cink(II)–hisztamin rendszerben a különböző pH-kon, koncentrációknál illetve fém–ligandum arányoknál meghatározott sebességi állandók és a vizsgált pH-tartományban jelenlévő öt részecske koncentrációeloszlásának ismeretében az alábbi egyenlet alapján meghatározhatjuk az egyes részecskék egyedi hozzájárulásait a hidrolízishez:

$$k_{\text{obs}} = k_1 \times [\text{Zn}] + k_2 \times [\text{Zn}(\text{OH})] + k_3 \times [\text{ZnL}] + k_4 \times [\text{ZnL}_2] + k_5 \times [\text{ZnL}(\text{OH})]$$

A kapott sebességi állandók:

$$k_1 \approx 0, k_2 = 0,19 (\pm 0,01), k_3 = 7 (\pm 3) \times 10^{-3}, k_4 \approx 0, k_5 = 0,59 (\pm 0,02) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

A 43. és a 45. ábrán a folytonos vonal az ezen értékekkel számolt elméleti görbét mutatja. A k_2 pontos meghatározásához irodalmi adatokat is felhasználtunk [67]. A kapott másodrendű sebességi állandók alapján megállapíthatjuk, hogy a már feltételezett ZnLH_1 komplex mellett a $\text{Zn}(\text{OH})$ részecske is jelentős hidrolitikus aktivitással bír, bár ez utóbbi részecske ligandumfelesleg esetén sohasem képződik 7%-nál nagyobb koncentrációban. Mindkét hidroxokomplexben a hidroxidion, mint igen erős nukleofil reaktáns vesz részt az intramolekuláris katalízisben. Összehasonlítva a két hidroxokomplext, a ZnLH_1 háromszor nagyobb aktivitása azzal magyarázható, hogy az imidazolgyűrű koordinációja a létrejövő π -kölsönhatás révén elősegíti az O-donorokkal, s így a foszfátészterrel létrejövő vegyesligandumú komplex képződését. A többi részecske közül csak a ZnL rendelkezik kismértékű aktivitással. Ez esetben a fémionhoz koordinált víz a fémionhoz koordinált hidroxidionhoz hasonlóan vesz részt a mechanizmusban, azonban a jóval kisebb nukleofilitás sokkal kisebb hidrolitikus aktivitást eredményez. A ZnL komplex kismértékű hozzájárulása szintén az imidazolgyűrű π -akceptor sajátságosságával magyarázható, ami megnöveli a foszfát-diészterrel létrejött vegyesligandumú részecske stabilitását. Ezek alapján a ZnL_2 esetén jóval nagyobb aktivitást kellene tapasztalnunk, azonban a komplex valószínűleg tetraédes szerkezetű [23], ami megakadályozza a szubsztrát (cUMP) illetve a nukleofil reaktáns (H_2O) fémionkoordinációját.

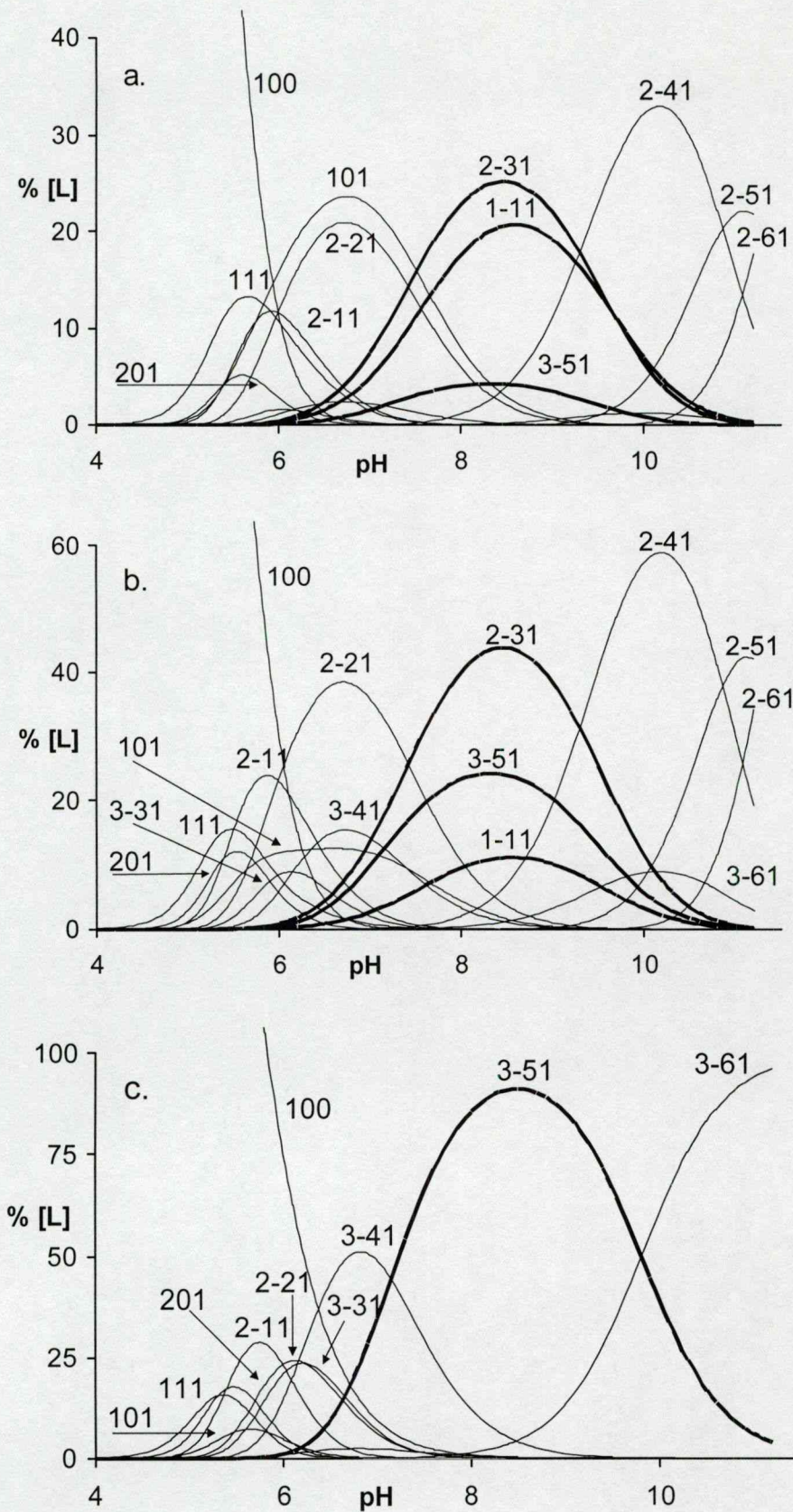
A cink(II)–dhen rendszer esetén az aktivitás jóval kisebb, széles pH-tartományban állandó, s csak magasabb pH-kon tapasztalunk növekedést (43. ábra). A sebességi állandó összkoncentrációtól való függését ebben a rendszerben $\text{pH} = 5,9$ -nél (ott ahol 90°C -on a Zn_2L_2 komplex a domináns) tanulmányoztuk (45.B ábra). Az egyenes meredeksége $\approx 0,5$, ami egyrészt összhangban korábbi eredményeinkkel kétmagvú komplex kialakulását valószínűsíti,

másrészt a két fémion együttműködését bizonyítja a hidrolízis során. A pH-metriásan megfigyelhető extra deprotonálódás eredményeképpen létrejövő ciklikus oligomer komplexek képződési tartományában a hidrolitikus aktivitás egy kissé lecsökken (43. ábra). Ezen megfigyelés is alátámasztja azt a korábban már említett tapasztalatot, hogy nem egyszerű vegyes hidroxokomplexek jönnek létre, hiszen ebben az esetben igen jelentős aktivitásnövekedést kellett volna tapasztalnunk. Magasabb pH-kon viszont valószínűleg a ZnLH_2 vegyes hidroxokomplex kialakulását tükrözi a nagyobb hidrolitikus hajlam.

Az eredmények alapján a cink(II)–dhen rendszer 2',3'-cUMP segítségével tanulmányozott hidrolitikus aktivitása széles pH-tartományban állandó, s csak magasabb pH-kon tapasztalunk növekedést. A cink(II)–hisztamin rendszer viszont meglehetősen aktívnek bizonyult a nemaktivált 2',3'-cUMP hidrolízisére vonatkozóan, hiszen közel három nagyságrenddel gyorsítja fel a 2',3'-cUMP autohidrolízisét ($k_{\text{obs,auto}} = 2,4 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, pH = 6,3), amely szinte megegyezik a legtöbbet vizsgált cink(II)–[12]aneN₃ rendszer aktivitásával [67]. Maga a hisztamin inaktív ($k_{\text{obs}} = 1,9 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, pH = 6,3, T = 363 K), így a tapasztalt hidrolitikus aktivitás a cink(II)komplexeknek tulajdonítható, s ez igencsak meglepő, hiszen általános az a vélekedés, hogy ez csak viszonylag rigid, polidentát például ciklikus ligandumok fémkomplexeinél várható.

4.5. Inozitolszármazékok réz(II)komplexeinek hatása aktivált foszfátészterek hidrolízisére

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálataiból kitűnt, hogy az alkoxohidas kétmagvú fémkomplexek igen hatékonyak lehetnek a foszfátészterkötés hidrolízisének tekintetében [113], ezért munkánk során számos ilyen vegyületet vizsgáltunk. Ezek két képviselője (tdci és tmci) a 8. ábrán látható, réz(II)komplexeik hidrolitikus aktivitását aktivált foszfátészterek segítségével szobahőmérsékleten tanulmányoztuk. A vizsgált vegyületek tulajdonképpen az 1,3,5-triamino-1,3,5-trideoxi-cisz-inozitol (taci) aminocsoportjain metilezett származékai, melyek szerkezetüknek és a donorcsoportjaiknak köszönhetően egyedülálló koordinációs sajátosságokkal rendelkeznek, hiszen eltérő hard-soft sajátosságokkal bíró fémionok számára egyaránt fémkötőhelyül szolgálnak. A taci esetén négy különböző koordinációs mód lehetséges ($\{N_{ax}, N_{ax}, N_{ax}\}$, $\{N_{ax}, O_{ekv}, N_{ax}\}$, $\{O_{ax}, O_{ax}, O_{ax}\}$ illetve $\{O_{ax}, N_{ekv}, O_{ax}\}$ [114]). Az aminocsoportjain dimetilezett tdcí komplexeiben csak a két utóbbit részesíti előnyben, mivel a nagy térkitöltésű dimetilaminocsoportok axiális pozíciója az erős intramolekuláris taszítás miatt nem kedvezményezett, ezáltal csak azok a kötődési módok jöhetnek szóba, amelyekben a nitrogének ekvatoriális helyzetben helyezkednek el. Ezek közül a 3d sor vége felé található átmenetifémek, mint például a réz(II) az $\{O_{ax}, N_{ekv}, O_{ax}\}$ típusú koordinációt részesíti előnyben. Ennek köszönhetően alkoxohidas többmagvú komplexek képződésére nyílik lehetőség. Célunk az volt, hogy az ily módon egymáshoz közel kerülő fémionok lehetséges kooperációját kihasználjuk a foszfodiészterek hidrolízisének folyamatában. Irodalmi adatok alapján a szerkezetileg hasonló réz(II)-cisz-cisz-1,3,5-triamino-ciklohexán rendszer hatékonyan segíti elő a foszfodiészterek hidrolízisét [64,73], azonban az általunk vizsgált ligandumok hidroxilcsoportjainak jelenléte alapvetően eltérő szerkezetű és összetételű komplexek kialakulásához vezethet. Ugyanakkor a fémionhoz kötött alkoxocsoport sok esetben hatékonyabb nukleofil reaktánsként szerepelhet a foszfoészterek hidrolízise során, mint a fémionhoz kötött hidroxidion [61,115,116]. Az együttműködés keretében végzett munkám a réz(II)-tdci és a réz(II)-tmci rendszerekben képződő komplexek aktivált foszfátészterek hidrolízisére gyakorolt hatásának tanulmányozása volt. A továbbiakban a réz(II)-tdci rendszerre vonatkozó azon eredményeket szeretném bemutatni, melyek nem képezik részét doktori munkámnak, azonban az általam végzett vizsgálatok értelmezését jelentősen megkönnyítik. A réz(II)-tmci rendszerre vonatkozóan ilyen jellegű adatok még nem állnak rendelkezésünkre.



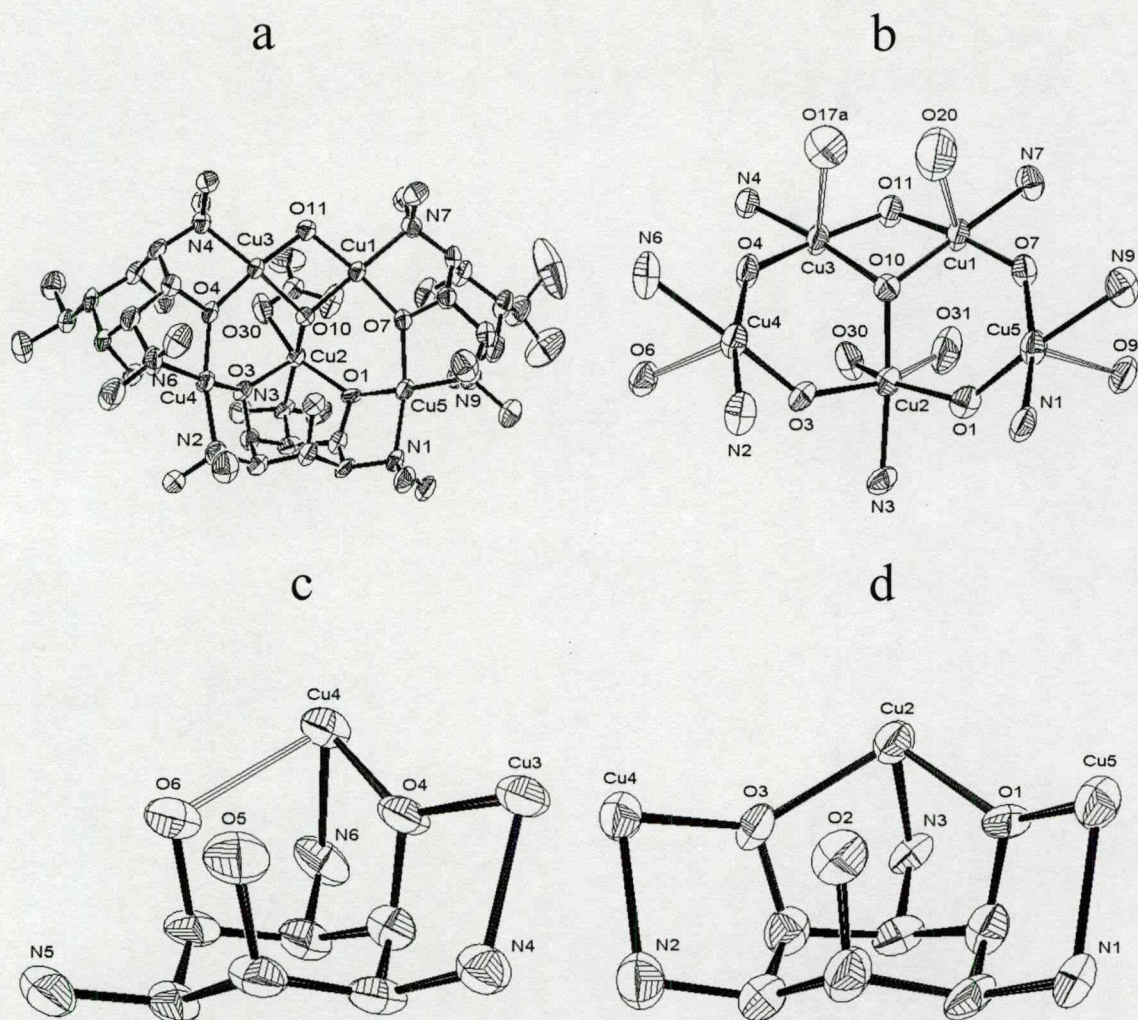
46. ábra Hegetschweiler és munkatársai által meghatározott eloszlásgörbék a réz(II)–tdci rendszerben; $[Cu]/[L] = 1/1$ (A), $2/1$ (B) és $3/1$ (C), $[L] = 4,4 \times 10^{-4} M$ ($T = 298 K$, $I = 0,1 M KCl$)

A réz(II)–tdci rendszerben elvégzett hidrolitikus vizsgálatok a korábban közöltnél [117] jóval összetettebb oldatspeciációt valószínűsítettek (pl. háromszoros fémfelesleg esetén is vízdoldható komplexek képződnek a teljes pH-tartományban), ezért a kooperációban résztvevő német kutatócsoport igen részletes vizsgálatokat (27 független titrálás, a fém–ligandum arány 1:4 és 3:1 között változott illetve a pH-metriás méréseket egyidejűleg spektrofotometriásan is követték) végzett a rendszer pontosabb egyensúlyi leírása érdekében. Az újabb eredmények alapján a kutatók a 46. ábrán látható részecskeeloszlást javasolják. Látható, hogy nagyszámú különböző protonáltsági állapotú egy-, két- sőt hárommagvú komplex alakul ki a fém–ligandum arány és a pH függvényében. A komplexképződés pH 4-5 körül indul, az egymagvú komplexek (CuLH , CuL és CuLH_{-1}) ligandumfelesleg alkalmazása mellett illetve 9,5-es pH alatt képződnek nagy mennyiségben. Érdekes módon a többmagvú részecskék (Cu_nLH_x , $n = 2,3$; $x = 0-6$) még négyszeres ligandumfelesleg esetén is jelen vannak és pH 9,5 fölött minden rendszerben dominánssá válnak. Ekvimoláris összetételnél és 2:1 fém–ligandum aránynál a kétmagvú komplexek tekinthetők fő részecskéknek a teljes pH-tartományban. A hárommagvú komplexek (Cu_3LH_x , $x = 3-5$) 3:1 fém–ligandum arány mellett és pH 6 fölött alakulnak ki nagy mennyiségben. Felmerül a kérdés, hogy mi lehet ezen komplexek szerkezete. A tdcí által kedvezményezett kétféle koordinációs módnak köszönhetően a fémionok számára négy kötődési hely adódik (egy, csak axiális oxigéndonoratomokból álló $\{\text{O}_{\text{ax}}, \text{O}_{\text{ax}}, \text{O}_{\text{ax}}\}$ illetve három $\{\text{O}_{\text{ax}}, \text{N}_{\text{ekv}}, \text{O}_{\text{ax}}\}$ típusú). Az $\{\text{O}_{\text{ax}}, \text{O}_{\text{ax}}, \text{O}_{\text{ax}}\}$ koordinációs módot csak a többszörös pozitív töltéssel bíró hard fémionok kedvelik, így a réz(II)–tdci rendszerben feltételezhetően $\{\text{O}_{\text{ax}}, \text{N}_{\text{ekv}}, \text{O}_{\text{ax}}\}$ típusú koordinációval bíró részecskék alakulnak ki. A pH-metriásan meghatározott stabilitási állandókból a $\text{Cu}_x\text{LH}_y + \text{Cu} = \text{Cu}_{x+1}\text{LH}_y$ egyenlet alapján számolható származtatott állandók hasznos információt szolgáltatnak az O-donoratomokra vonatkozóan, melyek hidroxil- és alkoxocsoportként is koordinálódhatnak. Nevezetesen minél deprotonáltabb a kiindulási komplex, annál nagyobb a folyamat képződési állandója, vagyis minél több alkoxocsoport van jelen, annál erősebb a koordináció. A létrejövő komplexek feltételezett szerkezetének igazolására a kutatók különböző szerkezetvizsgáló módszereket (spektrofotometria, ESR, tömegspektrometria) használtak. A látható spektrumok alapján a fém–ligandum arány növekedésével a d-d tartományban jelentős (70-80 nm) vörös eltolódás figyelhető meg, ami a tetragonális szimmetria torzulására utal és valószínűleg a Cu_3LH_5 komplex kialakulásának köszönhető. Emellett a fém–ligandum arány növekedésével 350 nm körül egy intenzív töltésátviteli sáv figyelhető meg, ami az alkoxohidas réz(II)centrumok jellemző sajátása. Az ESR-spektrumok

alapján az egymagvú komplexekben a fémionhoz egy nitrogéndonor koordinálódik. A kétmagvú komplexek ESR-csendes spektruma arra utal, hogy erős antiferromágneses kölcsönhatás alakul ki a fémcentrumok között. A hárommagvú komplexek ESR-aktív spektrummal rendelkeznek, azonban ez jelentősen különbözik az egymagvú komplexek esetén detektált jeltől. A pH-metriás és a spektroszkópiás eredmények alapján a képződő komplexekben a réz(II)ionokhoz nagy valószínűséggel a ligandum axiális hidroxil/alkoxo- és ekvatoriális aminocsoportjai, valamint a koordinált vízmolekulák deprotonálódása révén képződő hidroxidionok koordinálódnak.

Emellett a kutatóknak sikerült röntgenkristallográfiás mérésekre alkalmas egykristályt növeszteniük. A szilárd komplex bonyolult összetételű ötmagvú részecske $[\text{Cu}_5(\text{tdciH}_2)\text{tdci}_2(\text{OH})_2(\text{NO}_3)_2](\text{NO}_3)_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, melyben három ligandumhoz öt réz(II)ion koordinálódik. Az oldategyensúlyi vizsgálatok körülményei mellett ilyen összetételű komplex nem képződik, kialakulása úgy képzelhető el, hogy a semleges körülmények mellett nagy mennyiségben keletkező komplexek aggregálódnak, például két Cu_2LH_2 és egy CuL kapcsolódásával. Az ötmagvú komplex (47. ábra) két kétmagvú és egy hárommagvú egységből áll (a Cu_4 és a Cu_5 része mind a kétfajta egységnek).

Az öt fémion körül három különböző geometriájú koordinációs szféra alakul ki. A Cu_1 és a Cu_3 négyzetes piramisos geometriájú $\{\text{NO}_3 + \text{O}\}$ koordinációs szférával rendelkezik. A Cu_2 szintén négyzetes piramisos környezetben található, azonban $\{\text{N}_2\text{O}_2 + \text{O}\}$ típusú koordináció jellemzi. A Cu_4 és a Cu_5 körül erősen torzult oktaéderes geometria alakul ki $\{\text{NO}_4 + \text{O}\}$ koordinációval. A fémionok hidroxo-vagy alkoxohídon keresztül kapcsolódnak egymáshoz és ezáltal egy Cu_5O_6 összetételű klaszter alakul ki (47.b ábra). Az egymáshoz közvetlenül kapcsolódó réz(II)ionok 2,916–3,782 Å távolságra helyezkednek el egymástól, a távoliak között a fém–fém távolság 5,455–5,712 Å.



47. ábra A $[Cu_5(tdcH-2)tdci_2(OH)_2(NO_3)_2]^{4+}$ ion röntgenszerkezete ORTEP ábrázolásban (a) és a létrejövő Cu_5O_6 adduktum kinagyítva (b) (a hidrogénatomok, a nitrátionok $N(13)O_3^-$ kivételével nincsenek feltüntetve) valamint az alkoxo-hidas kétmagvú (c) és hárommagvú (d) fragmensek

4.5.1. A réz(II)–tdci rendszer

Mivel az előzetes eredmények alapján (46. ábra) a réz(II)–tdci rendszer speciációja igen változatos képet mutatott az alkalmazott fém–ligandum aránytól függően, ezért elsőként azt vizsgáltuk, hogy milyen összetételnél képződik a hidrolitikus hatással bíró részecske. A kinetikai mérések során három aktivált foszfátésztert alkalmaztunk szubsztrátként: a bisz(4-nitrofenil)-foszfátot (bnpp), a 4-nitrofenil-foszfátot (npp) és a 2,4-dinitrofenil-etil-foszfátot (dnpep). Az elővizsgálatok alapján a réz(II)–tdci rendszer a bnpp hidrolízisét segíti elő a leghatékonyabban. A 48. ábra a bnpp hidrolízisére meghatározott sebességi együtthatók fém–ligandum arány függését mutatja. A kapott harangalakú görbe maximumához rendelhető érték alapján egyértelmű, hogy kétmagvú komplex felelős a hidrolitikus aktivitásért. Az 1:1 aránynál tapasztalható viszonylag jelentős aktivitás annak köszönhető, hogy a 2:1 fém–ligandum aránnyal bíró komplex számottevő mennyiségben képződik már az ekvimoláris összetételű oldatban is (46. ábra). A háromszoros fémfelesleg mellett mérhető sebességi együttható értéke azt mutatja, hogy az ilyen körülmények mellett 100 %-ban jelenlévő hárommagvú komplexek a szabad ligandumhoz hasonlóan szinte teljesen inaktívnak bizonyultak a bnpp hidrolízisére vonatkozóan.

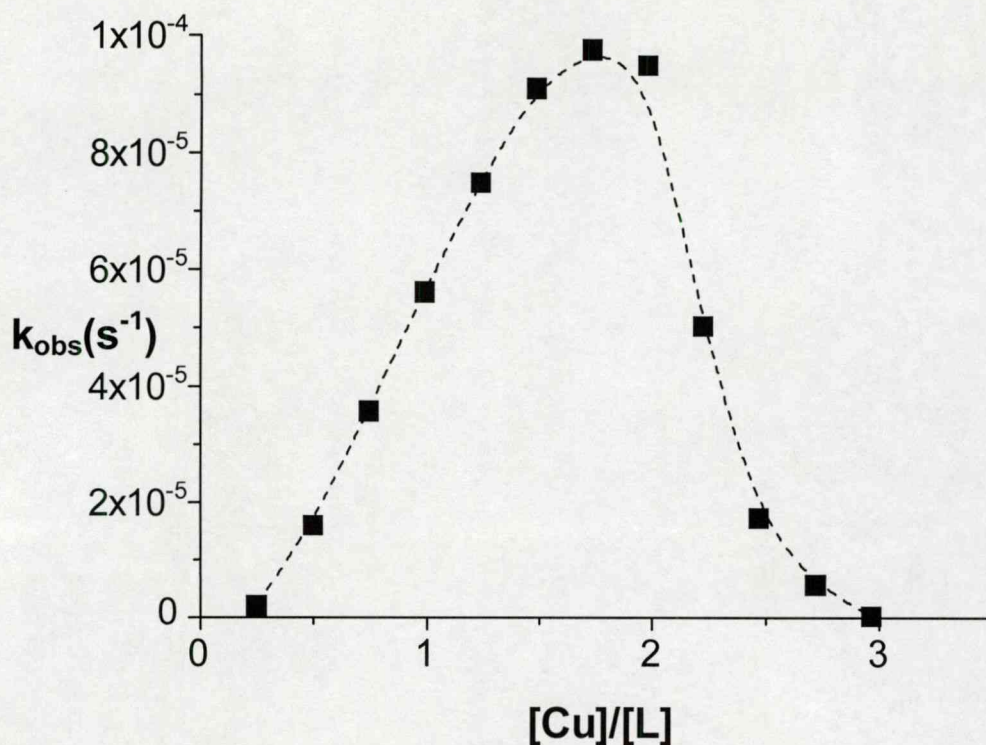
A meghatározott 2:1 összetételnél a pszeudo elsőrendű sebességi együtthatók pH-függése a különböző szubsztrátok esetén a 49. ábrán látható. A kapott eredményeket az egyensúlyi mérésekkel összevetve (46. ábra) lehetővé vált az aktív részecske protonáltsági állapot szerinti azonosítása is. A $\text{pH} = 7,5\text{--}9,5$ tartományban három részecske (CuLH_1 , Cu_2LH_3 illetve Cu_3LH_5) mutat koncentrációmaximumot, a hárommagvú komplexet a pszeudo elsőrendű sebességi együtthatók fém–ligandum arány függése alapján eleve kizárhatjuk. Az 1:1 és 2:1 rendszereket összehasonlítva pedig könnyen belátható, hogy az egymagvú komplex sem jöhet számításba. Nevezetesen 2:1 fém–ligandum aránynál kb. kétszer nagyobb hidrolitikus aktivitás mérhető, mint 1:1 összetételnél, ugyanakkor az egymagvú komplex ilyen körülmények között csak feleakkora mennyiségben képződik, míg a kétmagvú komplex százalékos mennyisége megkétszereződik. Ezek alapján egyértelmű, hogy a réz(II)–tdci rendszerben a hidrolitikus aktivitás a Cu_2LH_3 összetételű komplexhez rendelhető. A dnpep jelenlétében mért pszeudo elsőrendű sebességi állandók kb. feleakkorák, mint a bnpp esetén. A tapasztalt aktivitáscsökkenést egyszerűen statisztikai okokkal magyarázhatjuk, hiszen a dnpep csak egy aktivált foszfoészterkötést tartalmaz szemben a bnpp-vel. Az npp – amely tulajdonképpen a bnpp hidrolízisének terméke – esetén a maximumhoz tartoz pszeudo elsőrendű sebességi állandó értéke azonos körülmények mellett

kb. 150-szer kisebb, mint a bnpp esetén, ezért a bnpp hidrolízisére vonatkozó számításaink során a termék továbbalakulását elhanyagoltuk.

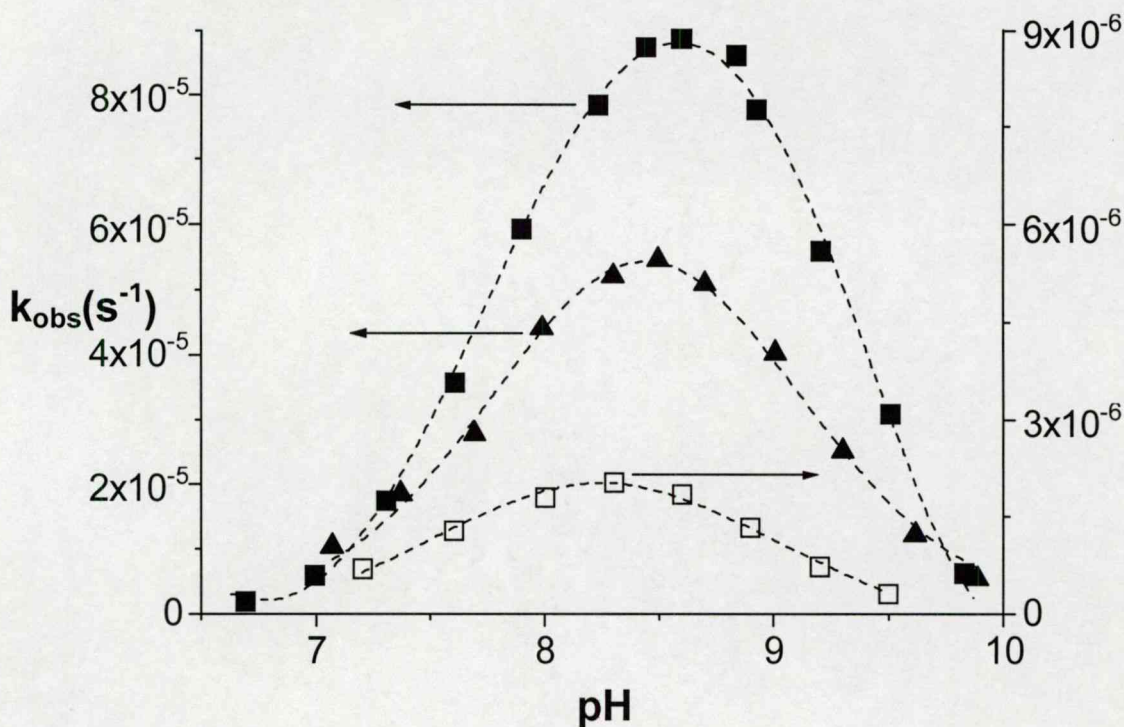
A következőekben telítési kinetikai mérésekkel próbálkoztunk, de ez a hagyományos módon nem volt kivitelezhető, mivel a bnpp néhány mM-nál nagyobb koncentrációban nem oldódik vízben. Ezért fordított módszert alkalmaztunk és a komplex koncentrációjának növelésével próbáltuk elérni a telítést a katalitikus sebességi állandó meghatározása céljából. Azonban ebben az esetben sem sikerült kimérnünk a teljes telítési görbét (50. ábra), ugyanis az a komplex igen erős elnyelése miatt, technikailag nem volt elérhető. Így az 50. ábrán is megadott kísérleti pontokból a Michaelis-Menten kinetika feltételezésével számítható paraméterek ($K_M \geq 0,024 \text{ M}$, $k_{\text{kat}} \geq 0,02 \text{ s}^{-1}$) csak közelítő értékeknek tekinthetők. Mindazonáltal a meghatározott másodrendű sebességi állandó ($k_2 = 0,75 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a kezdeti sebességek módszerével meghatározott kinetikai adatok alapján illetve $0,95 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a teljes kinetikai görbe segítségével számolva) a Cu_2LH_3 komplex rendkívül nagy hidrolitikus aktivitására utal, hiszen értéke 47600-szorosa a szintén erős nukleofil hidroxidion hasonló értékénél ($k_{\text{OH}} = 2 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), ami 4 mM aktív komplex jelenlétében 35 milliószoros gyorsulást eredményez az autohidrolízissel összehasonlítva pH = 8,6 esetén [118].

A bnpp részéről felmerült oldékonysági problémák kiküszöbölésére a vízdékonyabb dnpep-vel is végeztünk telítési kinetikai vizsgálatokat (51. ábra). Ebben az esetben sikerült a dnpep koncentrációjának növelésével a telítési szakaszt elérnünk, ami bizonyítékkul szolgál arra, hogy a hidrolízis előegyensúly révén kialakuló komplex–szubsztrát átmeneti terméken keresztül játszódik le. A nemlineáris paraméterbecslés segítségével meghatározott Michaelis-Menten állandó ($K_M = 26,2 \text{ mM}$, $K_{\text{assz}} = 1/K_M = 38 \text{ M}^{-1}$) értéke alapján a dnpep közepes erősséggel kötődik a Cu_2LH_3 komplexhez, míg a katalitikus sebességi állandó ($k_{\text{kat}} = 5,54 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) nagysága rendkívül gyors hidrolízisre utal [64].

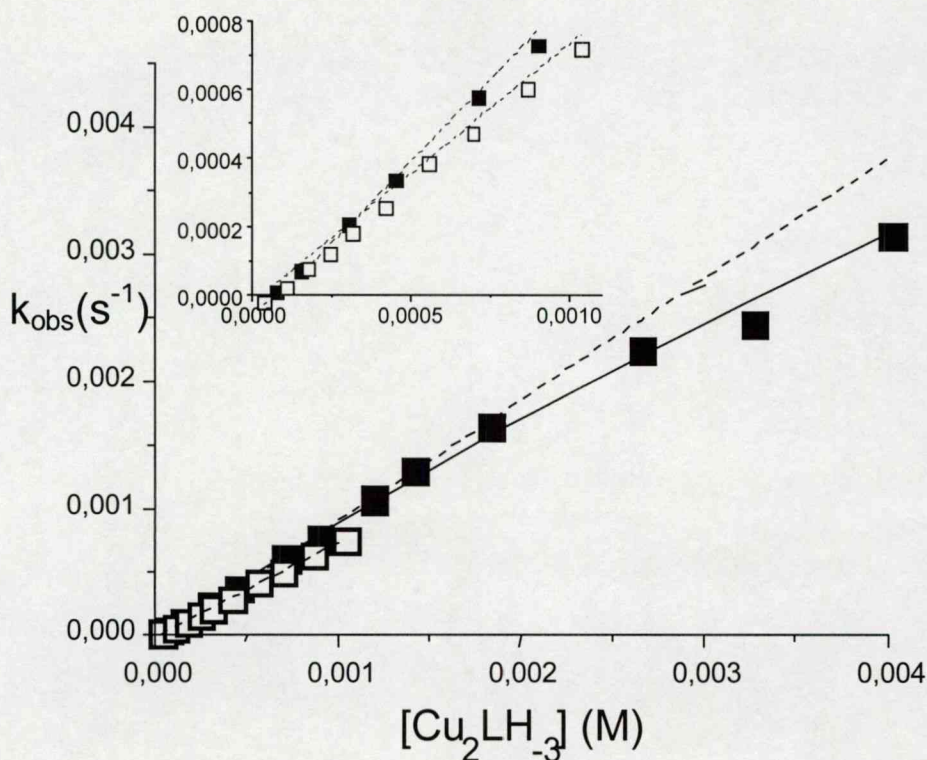
A lejátszódó reakció valóban katalitikusnak tekinthető, hiszen tízszeres bnpp fölösleg mellett 9 katalitikus ciklust mértünk 400 perc alatt, azonban a számolt görbénél kisebb aktivitást tapasztalhattunk (52. ábra), ami feltételezhetően a hidrolitikus folyamat során képződő nitrofenil-foszfát (npp) inhibiáló hatásának tulajdonítható. A kísérleti pontok jól leírhatóak egy az npp-vel kialakított inaktív vegyesligandumú komplex képződésének feltételezésével ($\text{Cu}_2\text{LH}_3^+ + \text{npp}^{2-} = [\text{Cu}_2\text{LH}_3(\text{npp})]^-$, $K = 490 \text{ M}^{-1}$, 52. ábra).



48. ábra A pszeudo elsőrendű sebességi együtthatók fém–ligandum arány függése a réz(II)–tdci rendszerben, $\text{pH} = 8,60$, $[\text{tdci}] = 4,6 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{bnpp}] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$



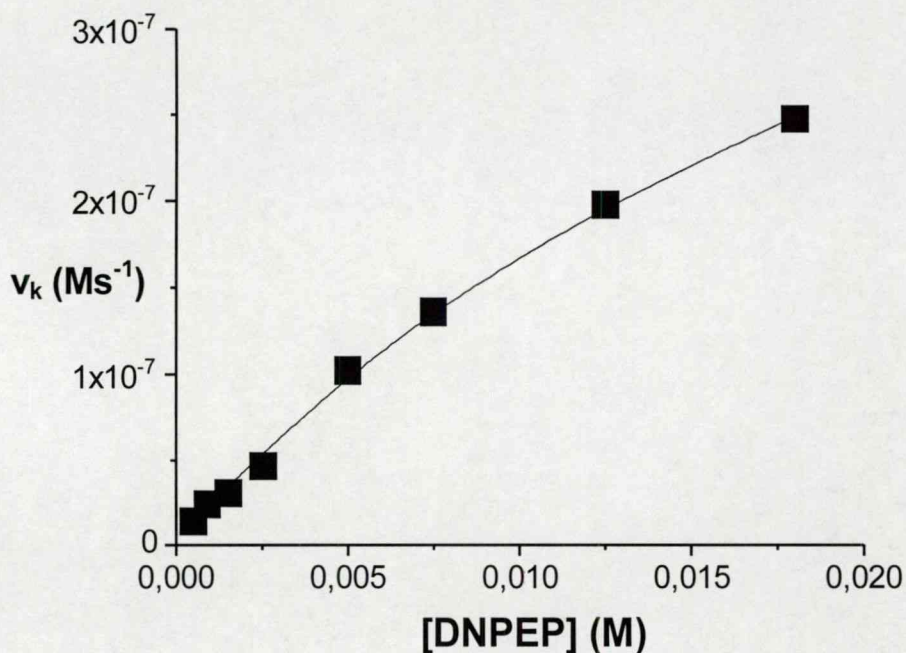
49. ábra A pszeudo elsőrendű sebességi együtthatók pH-függése a réz(II)–tdci rendszerben
 ■: $[\text{Cu(II)}] = 2[\text{tdci}] = 8,80 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{bnpp}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$; ▲: $[\text{Cu(II)}] = 2[\text{tdci}] = 8,85 \times 10^{-4} \text{ M}$,
 $[\text{dnpep}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$; □: $[\text{Cu(II)}] = 2[\text{L}] = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{npp}] = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$; $T = 298 \text{ K}$



50. ábra A pseudo elsőrendű sebességi együtthatók $[\text{Cu}_2\text{LH}_3]$ koncentrációtól való függése a réz(II)–tdci rendszerben, \square : $[\text{bnpp}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ (kezdeti sebességek módszere alapján);

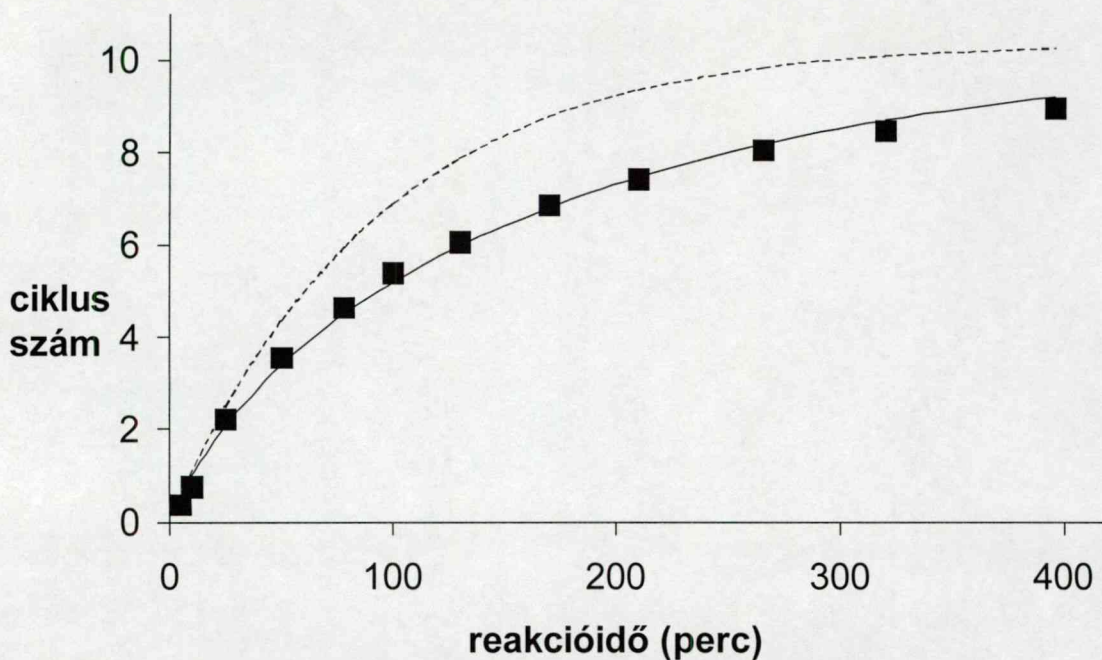
\blacksquare : $[\text{bnpp}] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (teljes kinetikai görbe felvételével);

$[\text{Cu(II)}]:[\text{L}] = 2:1$, $\text{pH}=8,60$, $T=298 \text{ K}$



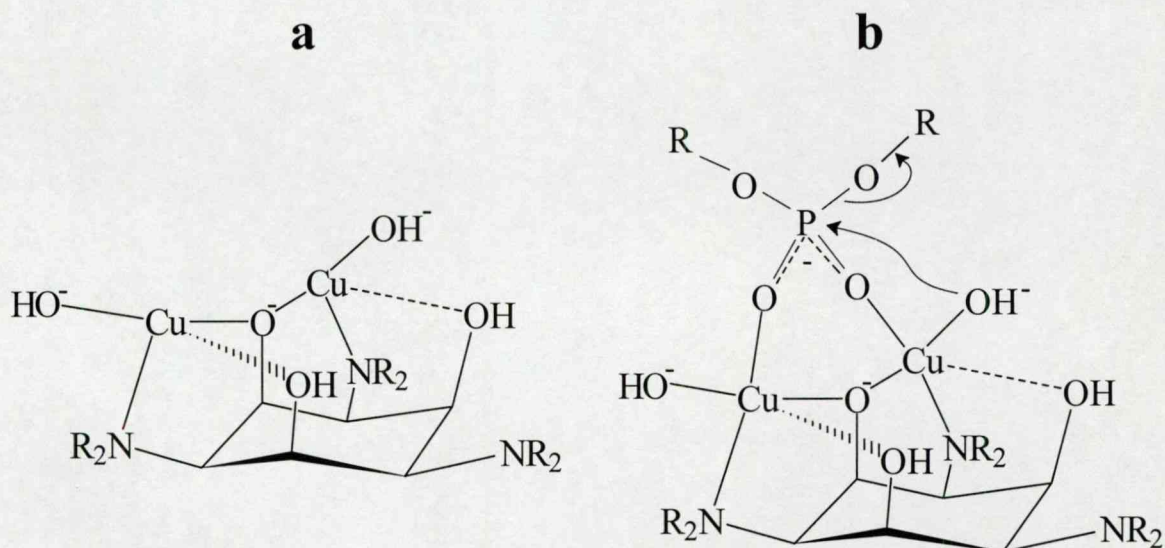
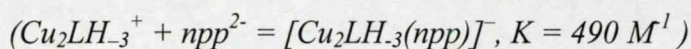
51. ábra A kezdeti sebesség dnpep koncentrációtól való függése a réz(II)–tdci rendszerben

$[\text{Cu}_2\text{LH}_3] = 1,1 \times 10^{-4} \text{ M}$, $\text{pH} = 8,60$, $T = 298 \text{ K}$



52. ábra A bnpp Cu_2LH_3 komplex által katalizált hidrolízisének folyamata a réz(II)–tdci rendszerben tízszeres bnpp felesleg esetén, $\text{pH} = 8,60$, $[\text{Cu}_2\text{LH}_3] = 2,55 \times 10^{-4} \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$;

A szaggatott vonal az ideális viselkedést jelöli, a folytonos pedig az inaktív vegyes ligandumú komplex feltételezésével számított görbe



53. ábra A réz(II)–tdci rendszerben képződő Cu_2LH_3 komplex valószínűsített szerkezete (a)

(a fémionokhoz további vízmolekulák kötődése feltételezhető)

és a bnpp hidrolízisének lehetséges mechanizmusa (b)

Az aktív komplex szerkezetére a Hegetschweiler és munkatársai által előállított szilárd komplex hasonló kétmagvú alegysége, valamint az elvégzett oldatspektroszkópai vizsgálatok alapján az 53.a ábrán látható szerkezetet valószínűsíthetjük, amelyben a kétmagvú centrum fémionjai alkoxo-hídon keresztül kapcsolódnak egymáshoz. A bnpp Cu_2LH_3 komplex által elősegített hidrolízisének feltételezett mechanizmusát az 53.b ábra mutatja.

Az aktív komplex javasolt szerkezete alapján az alkoxo-hídon keresztül kapcsolódó fémionokhoz két hidroxidion kötődik, habár az a szerkezet sem zárható ki teljesen, amelyben mindhárom hidroxilcsoport fémion által elősegített deprotonálódásával a foszfoészterek hidrolízisében hatékonyak bizonyult alkoxocsoportok jönnek létre. Ha ezen utóbbi folyamatot valószínűsítjük, akkor a bnpp átésztereződésével egy új, nemaktivált foszfoészterszármazék képződne. Ezt a bnpp-nél hidrolitikusan stabilabb átmeneti terméket azonban HPLC-vel nem sikerült detektálnunk. Fordított fázisú HPLC-technikával viszont kimutatható, hogy az aktív komplex hatására a bnpp p-nitrofenolátra és p-nitrofenil-foszfátra (npp) bomlik, vagyis a folyamat valóban hidrolitikus és nem egy fémionhoz kötött alkoxocsoport nukleofil támadása révén megvalósuló átészterezési folyamat játszódik le. A hidrolízis kétfajta mechanizmus szerint játszódhat le, nevezetesen a fémhez kötött hidroxidion direkt nukleofil támadása révén illetve általános báziskatalitikus folyamatot feltételezve. Utóbbi esetben a fémhez kötött hidroxidion további vízmolekulákat aktivál és az így létrejövő hidroxidion hajtja végre a nukleofil támadást. Esetünkben a Cu_2LH_3 komplex rendkívül nagy aktivitása alapján a fémhez kötött hidroxidion direkt nukleofil támadását valószínűsíthetjük.

A röntgenszerkezetvizsgálatok alapján az alkoxohídon keresztül kapcsolódó fémionok 3,6-3,8 Å távolságra helyezkednek el egymástól, ami kb. megfelel a kétmagvú foszfoészteráz enzimek aktív centrumában lévő fémionok távolságának. Számos eredmény született arra vonatkozóan, hogy a foszfodiészterek μ -1,3-hidas formában megkötődhetnek hasonló fém-fém távolsággal bíró alkoxo- [113] vagy fenoxo-hidas [119] kétmagvú centrumokon. A réz(II)-tdci rendszerben képződő kétmagvú részecske kiemelkedő aktivitását is így magyarázhatjuk, vagyis a szubsztrát 1,3-hidas formában kötődik a Cu_2LH_3 komplexhez, ami a szubsztrát kétszeres Lewis-sav aktiválását eredményezi, majd az egyik fémcentrum hidroxidionja közvetlen nukleofil támadást hajt végre a szubsztrát foszforatomján, melynek eredményeképpen a foszfátészterkötés felhasad (53. ábra). A javasolt mechanizmus szerint tehát az általunk vizsgált rendszerben kétszeres Lewis-sav aktiválás révén megvalósuló intramolekuláris nukleofil katalízis játszódik le.

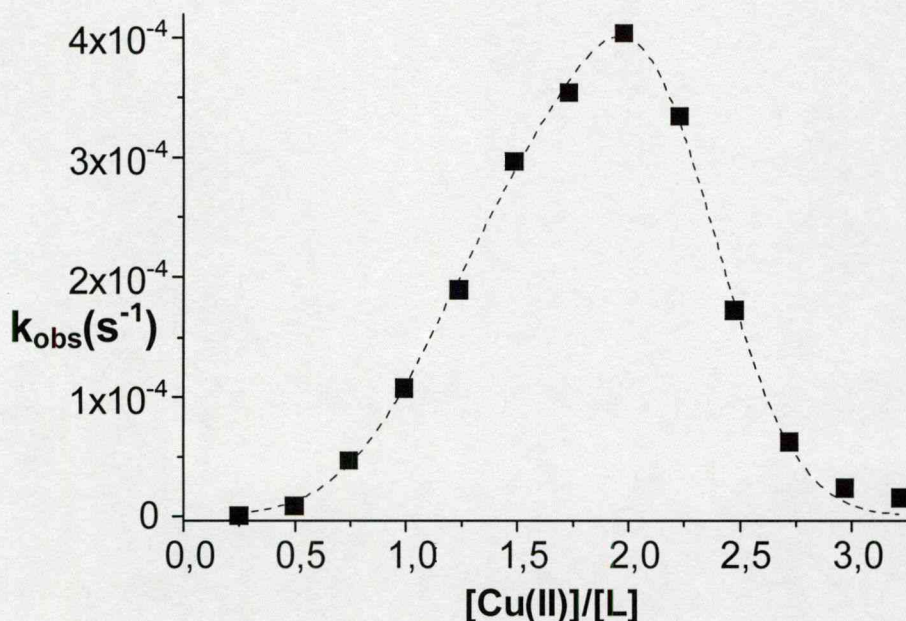
Összegzőképpen elmondható, hogy a réz(II)–tdci rendszer rendkívül hatékonyan segíti elő a bnpp hidrolízisét és emellett szelektív a diészterek tekintetében, ami irodalmi adatok alapján igencsak ritkán fordul elő [120]. Általában azt tapasztalhatjuk, hogy a foszfátészterkötés hidrolízisében kiemelkedően aktív komplexek ugyanolyan mértékben illetve még gyorsabban képesek a monoészterek hasítására, mint a diészterek, ami kedvezőtlen pl. a mesterséges nukleázok kifejlesztése tekintetében. Emellett a hidrolízis katalitikusnak bizonyult, ami szintén igen ritkán fordul elő a hatékony rendszerek esetében [121,122]. Kétértékű fémiont tartalmazó komplexek közül tudomásunk szerint a réz(II)–tdci rendszerben kialakuló Cu_2LH_3 összetételű részecske segíti elő leghatékonyabban a bnpp hidrolízisét illetve ugyanez mondható el a legtöbb lantanoida(III)kompleksszel összehasonlítva is, csupán néhány lantanoida(III)– H_2O_2 rendszer [123] illetve a négyértékű fémionok (Zr(IV) és Ce(IV)) rendelkeznek az általunk vizsgált rendszerénél nagyobb hidrolitikus aktivitással [124,125].

4.5.2. A réz(II)–tmci rendszer

Mivel a réz(II)–tdci rendszer hatékonynak bizonyult a bnpp hidrolízisére vonatkozóan, ezért megvizsgáltuk a rokonvegyület tmci réz(II)komplexeinek hidrolitikus aktivitását is. Ebben az esetben azonban bnpp-vel a kezdeti gyors hidrolízis után a folyamat lelassult, amit úgy magyarázhatunk, hogy csak a bnpp-ben lévő néhány tized százalék npp hidrolizál el gyorsan. Ezt erősítették meg részletesebb vizsgálataink is, így a réz(II)–tmci rendszer gyakorlatilag inaktív bnpp-vel, viszont rendkívül aktív npp-vel szemben. A kétszer negatív töltésű npp hidrolízisét csak nagyon kevés fémtartalmú rendszer képes nukleofil támadás révén felgyorsítani a semleges pH-tartományban a nukleofil hidroxidionra ható jelentős elektrosztatikus taszítás miatt. Ezek közé tartoznak az erősen Lewis-sav jellegű lantanoida(III)- illetve pl. a Zr(IV)- és Ce(IV)ionok. Hasonlóan az előbbi ligandumhoz először azt vizsgáltuk, hogy milyen fém–ligandum aránynál képződik a hidrolitikus hatással bíró részecske.

A pszeudo elsőrendű sebességi együtthatók fém–ligandum arány függése (54. ábra) ebben az esetben is harangalakú maximumgörbével írható le. A legnagyobb értéket 2:1 fém–ligandum aránynál mértük, ami arra utal, hogy hasonlóan a réz(II)–tdci rendszerhez, ez esetben is egy kétmagvú komplex felelős a hidrolitikus aktivitásért. Ennél kisebb illetve nagyobb arányoknál a sebességi állandók fokozatos csökkenését tapasztaltuk. Mindazonáltal – az egyensúlyi eredmények hiányában – a képződő 1:1 összetételű komplexek hidrolitikus

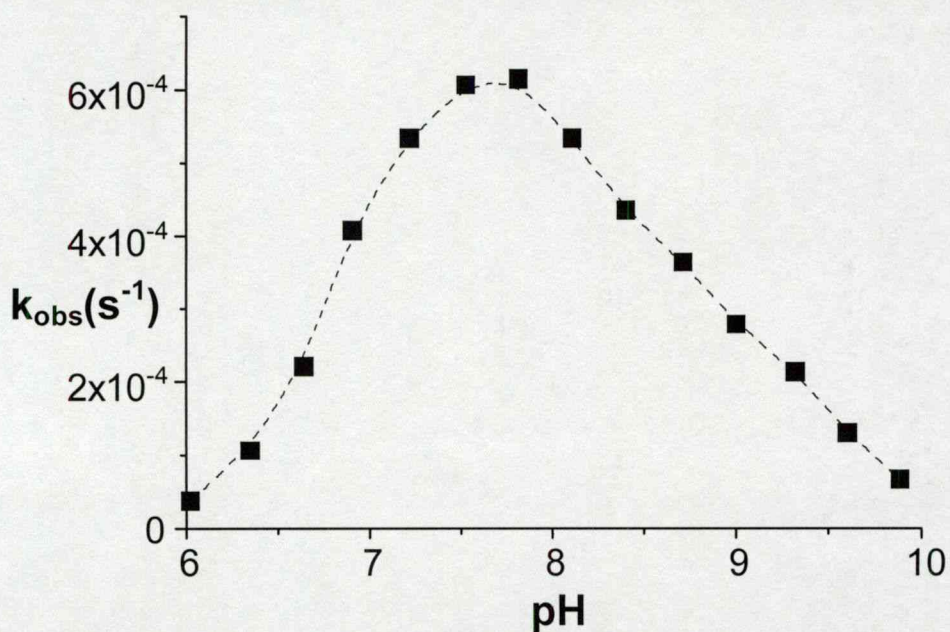
aktivitása sem zárható ki, viszont a kapott eredmények alapján ezek esetleges hozzájárulása a hidrolízishez elhanyagolható a kétmagvú komplex(ek)hez képest.



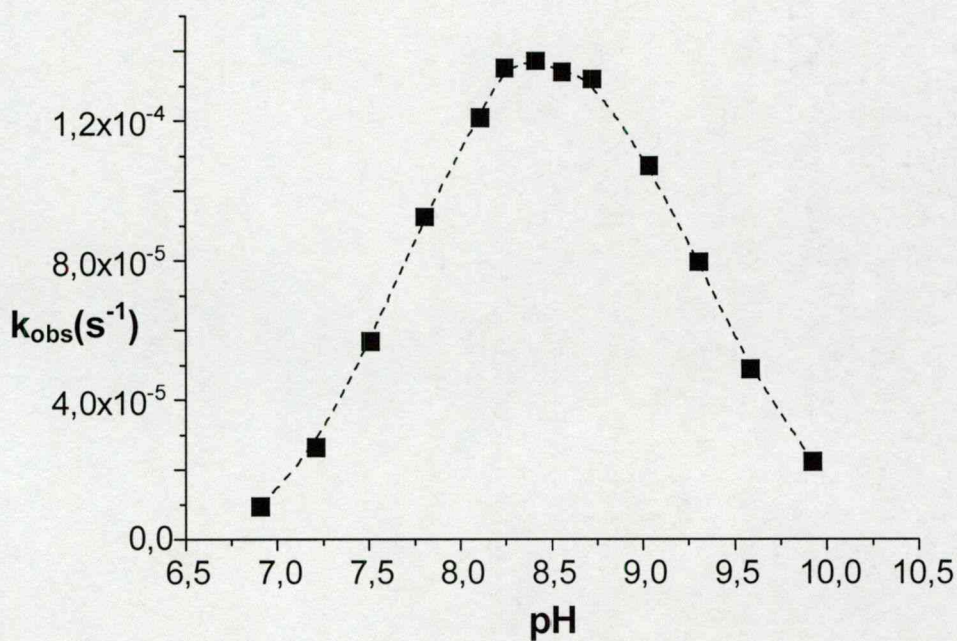
54. ábra A pszeudo elsőrendű sebességi együtthatók fém–ligandum arány függése a réz(II)–tmci rendszerben, $\text{pH} = 7,80$, $[\text{tmci}] = 4,5 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{npp}] = 1,25 \times 10^{-4} \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$

Az optimálisnak talált 2:1 fém–ligandum arány mellett meghatároztuk a pszeudo elsőrendű sebességi együtthatók pH-függését. Említésre méltó, hogy különböző szubsztrát–komplex arányok mellett eltérő görbéket kaptunk, bár minden esetben maximumgörbével írható le a pH-profil. Ha a komplexek koncentrációja négyszer akkora mint a szubsztráté (55. ábra), akkor a görbe maximuma $\text{pH}=7,8$ -nál, viszont négyszeres szubsztrátfelesleg esetén (56. ábra) $\text{pH}=8,4$ -nél található.

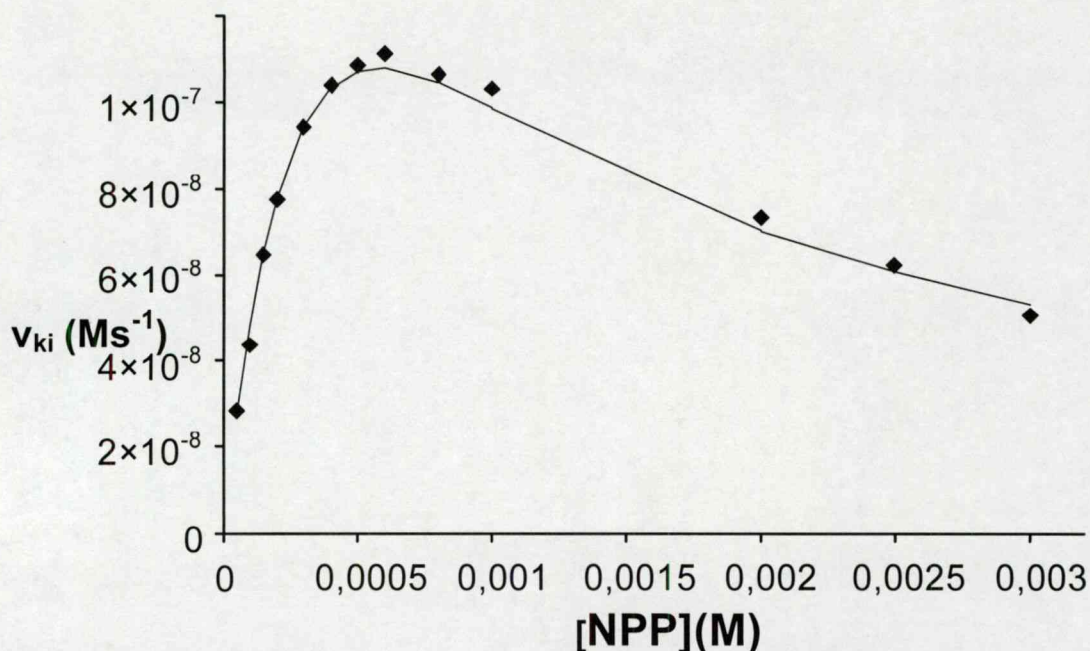
Ez arra utal, hogy a foszfomonoészter npp terner komplexek kialakulása révén számottevően eltolja az egyensúlyt a réz(II)–tmci rendszerben. Erre magyarázatot adhat a két negatív töltésű foszfomonoészterek viszonylag jelentős elektrondonor tulajdonsága, azaz stabil komplexek kialakítására való hajlama. Emellett, a két ábra összehasonlításából az is látható, hogy a kisebb komplex–szubsztrát arány (nagyobb szubsztrátkoncentráció) esetén a várhatónál a hibát meghaladó mértékben csökken a mért sebességi állandó, ami a szubsztrát inhibáló hatására utal. Ezért meghatároztuk a kezdeti sebesség szubsztrátkoncentrációtól való függését (57. ábra).



55. ábra A pszeudo elsőrendű sebességi együtthatók pH-függése komplexfelesleg esetén a réz(II)–tmci rendszerben, $2[\text{Cu(II)}] = [\text{tmci}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{npp}] = 1,25 \times 10^{-4} \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$



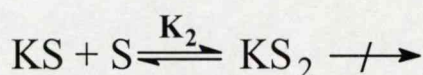
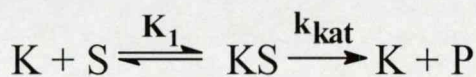
56. ábra A pszeudo elsőrendű sebességi együtthatók pH-függése szubsztrátfelesleg esetén a réz(II)–tmci rendszerben, $2[\text{Cu(II)}] = [\text{tmci}] = 1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{npp}] = 6 \times 10^{-4} \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$



57. ábra A kezdeti sebesség npp koncentrációtól való függése a réz(II)–tmci rendszerben

$$2[Cu(II)] = [tmci] = 3 \times 10^{-4} \text{ M}, pH = 8,10, T = 298 \text{ K}$$

Kis szubsztrátkoncentrációnál lineáris növekedés figyelhető meg, majd több mint kétszeres szubsztrátfölösleg felett a kezdeti sebesség csökken a szubsztrát koncentrációjának növelésével, tehát a szubsztrátkoncentrációtól való függés nem telítési jellegű. Ez a viselkedés alapvetően eltér attól, ami az egyszerű Michaelis-Menten féle kinetika alapján várható lenne és szubsztráthinibícióra utal. A szubsztrát gátló hatása az enzimeknél jól ismert, modellkomplexeknél azonban rendkívül ritkán előforduló jelenség. Az npp inhibíciója a következő mechanizmus segítségével magyarázható:

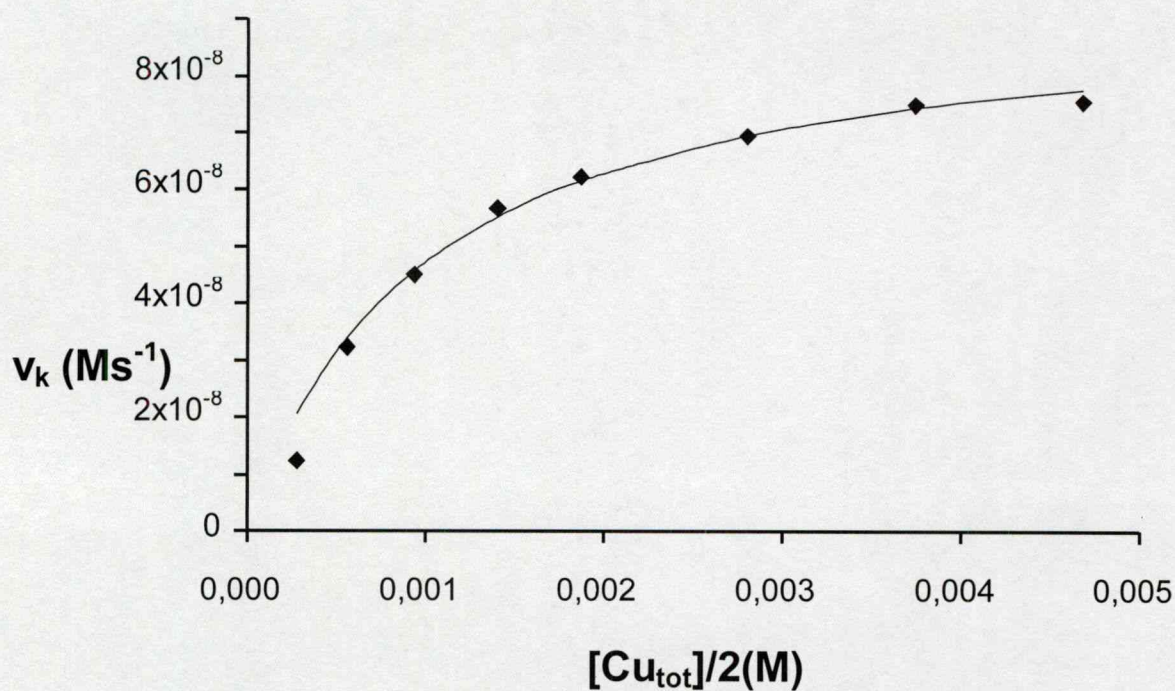


(ahol K = aktív komplex; S = npp szubsztrát; K_1 a KS, míg K_2 a KS_2 adduktum képződésének egyensúlyi állandója; k_{kat} a katalitikus sebességi állandó)

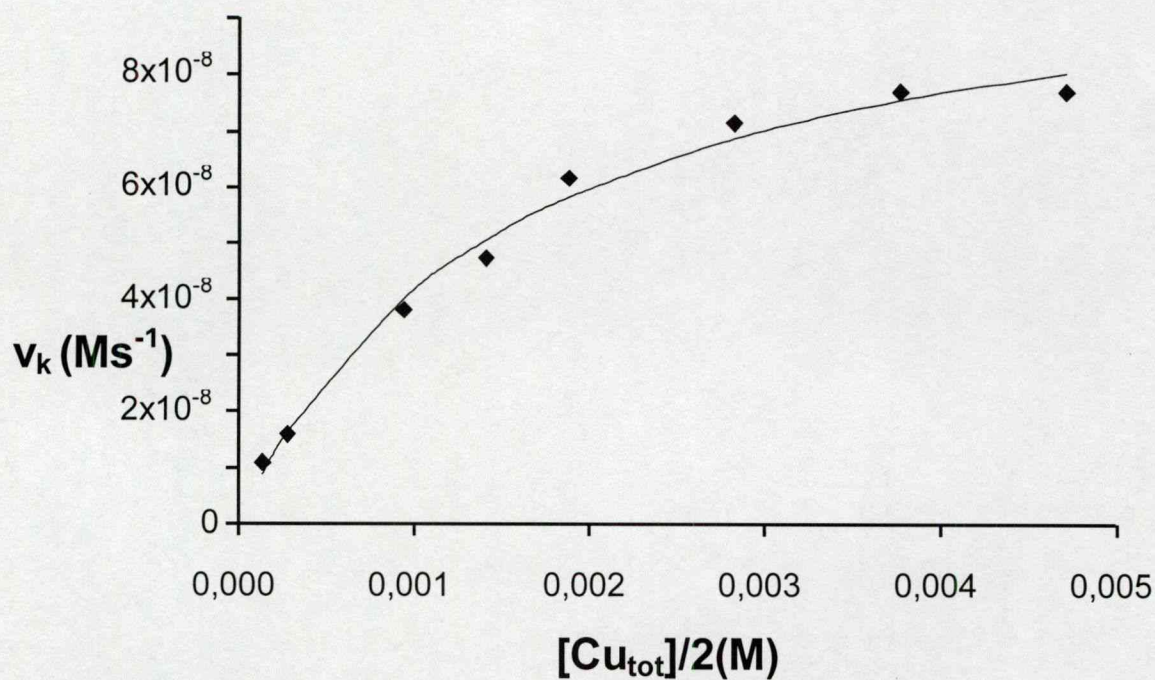
Az első egyenlet megfelel az egyszerű Michaelis-Menten-féle kinetikának, azaz az aktív részecske és a szubsztrát egy átmeneti komplexet képez s a továbbiakban egy k_{kat} sebességi állandóval jellemezhető intramolekuláris folyamat révén játszódik le a reakció. A szubsztrát inhibíciós hatása a második egyenletben jelölt folyamat alapján, nevezetesen az inaktív KS_2 adduktum képződésével értelmezhető. Az egyensúlyi adatok hiányában nincs

információnk az aktív komplex aktuális koncentrációjáról az adott körülmények között, ezért azt feltételeztük, hogy az aktivitásért felelős kétmagvú komplex 100 %-ban képződik. A mérési pontoknak a nemlineáris legkisebb négyzetek módszerével történő illesztése (folytonos vonal az 57. ábrán) a következő paramétereket szolgáltatta: $K_1 = 2146 \text{ M}^{-1}$, $K_2 = 1379 \text{ M}^{-1}$, $k_{\text{kat}} = 1,83 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. A meghatározott katalitikus sebességi állandó rendkívül nagy érték, főként ha figyelembe vesszük, hogy a fenti elhanyagolás miatt a valóságos k_{kat} értékének alsó határát jelenti. Fenti érték alapján a réz(II)-tmci rendszer kb. 200000-szeresére képes felgyorsítani pH 8 körül az npp autohidrolízisét ($k_{\text{auto}} = 9 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$) [126].

A katalitikus sebességi állandót fordított módszerrel, vagyis az aktív komplex koncentrációjának növelésével is meghatároztuk. Ekkor a szubsztrát koncentrációját kis értéken tartottuk, hiszen így elkerülhető volt a KS_2 komplex képződése, azaz az inhibíciós hatás jelentkezése. Ebben az esetben, minthogy a reakciósebességek illetve az alkalmazott kis szubsztrátkoncentráció azt lehetővé tették, a teljes kinetikai görbét felvettük. A reakció sebességi állandóját (ill. az ebből számolt kezdeti sebességet) két különböző pH-n (pH = 7,8 ill. 8,4) is meghatároztuk, melyeket az 58. és 59. ábrák mutatnak be. Mindkét görbe telítési jellegű, azonban kismértékben különböznek egymástól, ami várható is volt a komplexképződés pH-függése miatt. A sebesség kezdetben lineárisan változik a komplex(ek) koncentrációjának növelésével, majd telítésbe hajlik, amely jól értelmezhető a klasszikus Michaelis-Menten kinetikával. A mért pontokból a nemlineáris legkisebb négyzetek módszerével határoztuk meg az ismeretlen paramétereket (pH = 7,8-nál $k_{\text{kat}} = 1,45 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $K_M = 1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ illetve pH = 8,4-nél $k_{\text{kat}} = 1,60 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $K_M = 1,48 \times 10^{-3} \text{ M}$). Mivel az aktív komplex 100 %-os képződését feltételeztük, ezért eredményeink csak alsó becslésnek tekinthetők. Azonban a meghatározott katalitikus sebességi állandók jó egyezést mutatnak egymással illetve a szubsztrátkoncentráció függésből meghatározott k_{kat} értékkel ($1,83 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Minthogy k_{kat} értéke elhanyagolható az egyenletben szereplő másik két sebességi állandó mellett, a Michaelis-állandó jó közelítéssel azonos a KS adduktum képződési állandójának reciprokával. Így az utóbbi mérések alapján három független mérésből is számolhatjuk a KS adduktum képződési állandóját. A meghatározott K_1 értékek rendre 2146, 1000 ill. 677 M^{-1} (logaritmusuk 3,33, 3,00, 2,81). Figyelembe véve a kinetikai mérések pontosságát illetve az eltérő körülményeket, a fenti értékek jó egyezést mutatnak.



58. ábra A kezdeti sebesség függése a komplexkoncentrációtól $\text{pH} = 7,8$ -nál a réz(II)–tmci rendszerben, $[\text{Cu(II)}]:[\text{tmci}] = 2:1$, $[\text{npp}] = 6,5 \times 10^{-5}$, $T = 298 \text{ K}$



59. ábra A kezdeti sebesség függése a komplexkoncentrációtól $\text{pH} = 8,4$ -nél a réz(II)–tmci rendszerben, $[\text{Cu(II)}]:[\text{tmci}] = 2:1$, $[\text{npp}] = 6,5 \times 10^{-5}$, $T = 298 \text{ K}$

Összegzésképpen elmondható, hogy a réz(II)-tmci rendszer rendkívül hatékony az npp hidrolízisére vonatkozóan és emellett szelektív a monoészterek tekintetében. A kétszer negatív töltésű monofoszfátok (pl. npp) hidrolízisét csak nagyon kevés fémkomplex képes jelentősen meggyorsítani, azonban ezen fémionok illetve komplexeik esetén nem nagyon ismeretes a csak monofoszfátokat érintő szelektív hatás. Kétértékű fémionokat tekintve csak egyetlen cink(II)komplex ismeretes, amely viszonylag hatékonyan képes monofoszfátészterek hidrolízisét elősegíteni [61]. Ezen kétmagvú oktaazakriptand komplex (ld. 2.4.1. fejezet) további érdekessége, hogy hatása szelektív a foszfomonoészterekre csakúgy, mint a jelen esetben tárgyalt réz(II)-tmci rendszer. Aktivitásukat tekintve azonban jelentős különbség mutatkozik, hiszen azonos körülmények között a réz(II)-tmci rendszer mintegy 300-szor aktívabban képes elősegíteni az npp hidrolízisét.

5. Összefoglalás

Munkánk során elsősorban olyan kis molekulatömegű fémkomplexek vizsgálatát tűztük ki célul, amelyek nem csak szerkezeti, hanem funkcionális szempontból is metalloenzimek aktív centrumának modellvegyületei lehetnek. Ezen célkitűzés megvalósítása érdekében különböző, igen változatos szerkezettel bíró imidazolgyűrűt tartalmazó ligandumok kölcsönhatását vizsgáltuk réz(II)-, cink(II)- és nikkel(II)ionokkal. A potenciometriásan meghatározott részecskeeloszlás ismeretében spektroszkópiás módszerek (spektrofotometria, CD-, ESR- és NMR-spektroszkópia) segítségével javaslatot tettünk a képződő komplexek kötémódjára és oldatbeli szerkezetére vonatkozóan is. A tirozináz aktivitás kapcsán néhány imidazolszármazék és analógjaik katecholokkal történő vegyesligandumú komplexképződését vizsgáltuk. Az egyensúlyi mérések eredményei alapján hatékonynak remélt imidazoltartalmú rendszerekben aktivált és nemaktivált foszfátaszterek segítségével a foszfátaszterkötés hidrolízisére gyakorolt hatást tanulmányoztuk. A legtöbb réz- és cinkprotein aktív centrumát modellező, imidazolgyűrűt tartalmazó ligandumok mellett az előzetes vizsgálatok alapján ígéretes inozitolszármazékok réz(II)komplexeinek hidrolitikus aktivitását aktivált foszfátaszterek hidrolízisére vonatkozóan vizsgáltuk. A kinetikai mérések eredményeit az egyensúlyi vizsgálatokkal összevetve a legtöbb esetben beazonosítottuk a hidrolízist elősegítő aktív részecske összetételét és szerkezetét.

A kétfogúként koordinálódó imidazolszármazékok (aic, iaa, biim) réz(II)- cink(II)- és nikkel(II)ionokkal is ML és ML₂ összetételű törzskomplexekeket képeznek. Annak ellenére, hogy kis bázicitású imidazolnitrogéneket tartalmaznak, igen stabil komplexek kialakítására képesek az öt- illetve hattagú kelátgyűrűnek, valamint az imidazolgyűrűk erős π -akceptor sajátságainak köszönhetően. A réz(II)-iaa rendszerben a másik két ligandumtól eltérően a lúgos pH-tartományban oligomer komplexek is képződnek.

A bisz(imidazol-2-il) egységet tartalmazó ligandum (biib) rendkívül stabil egy- illetve kétmagvú réz(II)komplexeiben két-, három- illetve négyfogúként koordinálódik. Ekvimoláris összetételnél két fő részecske alakul ki (CuLH és Cu₂L₂), míg kétszeres fémfeleslegnél a Cu₂LH₁ összetételű komplex a domináns. A CuLH esetén az ESR-spektrumok két különböző szerkezetű kötési izomer jelenlétére utalnak. Az ekvimoláris rendszerben a semleges pH-tartomány környékén kialakuló Cu₂L₂ összetételű komplex egy igen jellegzetes, nagy zérustérfelhasadással bíró tripllett ESR-jelet ad, ami szimmetrikus, egymással közvetlenül nem csatolódó fémcentrumokat tartalmazó szerkezetet jelez. A biib a tripodális ("háromlábú")

ligandumok családjába tartozik, vizsgálataink igazolták, hogy a négy donorcsoport egy fémionhoz való koordinációja sztérikus okokból nem lehetséges, ellenben a ligandum szerkezete kedvez a kétmagvú komplexek kialakulásának.

A biib-hez hasonlóan tripodális, három imidazolgyűrűt tartalmazó, négyfogú bimha különböző protonáltsági állapotú mono- és biszkomplexeket képez réz(II)ionokkal, a cink(II)–bimha rendszerben azonban csak 1:1 fém–ligandum aránnyal bíró részecskék alakulnak ki. A legtöbb részecske valószínűleg (torzult) oktaéderes szerkezetű, azonban az ML komplexek ötös koordinációjúak, a CuL részecske feltételezhetően négyzetes piramisos geometriával bír, míg a ZnL komplex esetén valószínűleg trigonális bipiramisos geometria alakul ki. Az ML komplexek eltérő geometriája magyarázatot adhat a biszkomplexbépződés terén tapasztalt viselkedésre, nevezetesen az ekvatoriális pozícióban szabad koordinációs helyet tartalmazó CuL komplex valószínűleg könnyebben rendeződik át oktaéderes részecskévé, így biszkomplexé.

Az említett két, szerkezetileg hasonló tripodális ligandum (biib és bimha) alapvetően eltérő koordinációs kémiai sajátosságai azzal magyarázhatóak, hogy a bimha hosszabb "lábai" révén a négy donorcsoport egyetlen fémionhoz is képes koordinálódni.

A négyfogú, lineáris szerkezetű bimdm és mbimdm ligandumok réz(II)- és cink(II)ionokkal is rendkívül stabil $\{2N_{im}, 2N_{am}\}$ koordinációjú ML komplexeket képeznek széles pH-tartományban. Mindkét fémion esetén pH 9 fölött további deprotonálódás figyelhető meg, ami csak az mbimdm jelenlétében vezet vízzoldható MLH_1 összetételű részecske kialakulásához. Az mbimdm ZnL(OH) összetételű vegyes hidroxokomplexe képes az aktivált bisz(4-nitrofenil)foszfát hidrolízisét elősegíteni. A két ligandum fémkomplexei katecholaminokkal $MLAH_2$, $MLAH$ illetve MLA összetételű vegyeskomplexeket képeznek. Az L-dopa $MLAH_2$ komplexe kivételével, ahol aminosavtípusú koordináció a domináns, a második ligandum katecholtípusú koordinációval kötődik a fémionhoz. A négyfogú ligandumok katecholaminokkal képzett vegyes réz(II)komplexeiben legalább három, cink(II) esetén valószínűleg négy nitrogénnel koordinálnak a fémhez.

A hisztaminszerű donorcsoportokat tartalmazó hatfogú dhen réz(II)- és cink(II)ionokkal is igen stabilis, kétmagvú, bisz-hisztamin típusú koordinációval bíró M_2L_2 összetételű komplexeket képez a semleges pH-tartományban. A pH 10 fölött kialakuló MLH_2 részecske szerkezete azonban eltérő, a réz(II)tartalmú rendszerben az amidnitrogének deprotonálódása valószínűsíthető, míg cink(II) esetén a koordinált víz deprotonálódása révén feltételezhetően vegyes hidroxokomplexek jönnek létre. Az ESR-, CD- és NMR-spektroszkópiás mérések eredményei alapján a köztes pH-tartományban olyan négymagvú,

ciklikus oligomer komplexek alakulnak ki, ahol a négy fémiont kétfogúként koordinálódó imidazoláthidak kötik össze. A cink(II)–dhen rendszer 2',3'-cUMP segítségével tanulmányozott hidrolitikus aktivitása széles pH-tartományban állandó, s csak magasabb pH-kon tapasztalunk növekedést.

A cink(II)–hisztamin rendszer a várakozásainkkal ellentétben meglehetősen aktívnek bizonyult a nemaktivált 2',3'-cUMP hidrolízisére vonatkozóan. A különböző pH-kon, koncentrációknál illetve fém–ligandum arányoknál meghatározott sebességi állandók és a vizsgált pH-tartományban jelenlévő öt részecske koncentrációeloszlásának ismeretében meghatároztuk az egyes részecskék egyedi hozzájárulásait a hidrolízishez. A $\text{ZnL}(\text{OH})$ összetételű komplex mellett a kis mennyiségben képződő $\text{Zn}(\text{OH})$ részecske is jelentős hidrolitikus aktivitással bír.

A réz(II)–tdci rendszer rendkívül hatékonyan képes a vizsgált két aktivált DNS-modell – a 2,4-dinitrofenil-etil-foszfát és a bisz(4-nitrofenil)foszfát (bnpp) – hidrolízisét elősegíteni. A meghatározott másodrendű sebességi állandó értéke ($0,95 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) 47600-szorosa a szintén erős nukleofil hidroxidion hasonló értékénél és a mérhető sebességi állandó $3,5 \times 10^7$ -szerese az autohidrolízisnek (8,6-os pH-n és 4 mM aktív komplex jelenlétében). Az egyensúlyi mérések eredményei alapján a hidrolitikus aktivitásért felelős részecske Cu_2LH_3 összetételűnek adódott. A lejátszódó reakció katalitikusnak tekinthető, emellett a komplex szelektív a diészterek hidrolízisére vonatkozóan. A javasolt mechanizmus szerint az általunk vizsgált rendszerben kétszeres Lewis-sav aktiválás révén megvalósuló intramolekuláris nukleofil katalízis játszódik le. Kétértékű fémiont tartalmazó komplexek közül a réz(II)–tdci rendszerben kialakuló Cu_2LH_3 összetételű részecske segíti elő leghatékonyabban a bnpp hidrolízisét illetve ugyanez mondható el a legtöbb lantanoida(III)kompleksszel összehasonlítva is.

A réz(II)–tmci rendszer rendkívül hatékonyan képes elősegíteni a 4-nitrofenil-foszfát (npp) hidrolízisét és emellett szelektív a monoészterek tekintetében, mivel inaktívnek bizonyult a diészter bnpp-vel szemben. A kétszer negatív töltésű npp hidrolízisét csak nagyon kevés fémtartalmú rendszer képes nukleofil támadás révén felgyorsítani a semleges pH-tartományban, a nukleofil hidroxidionra ható jelentős elektrosztatikus taszítás miatt. A réz(II)–tdci rendszerhez hasonlóan, ez esetben is egy kétmagvú komplex felelős a hidrolitikus aktivitásért. A kezdeti sebesség szubsztrátkoncentrációtól való függése szubsztráthinhibícióra utal, ami enzimeknél jól ismert, modellkomplexeknél azonban rendkívül ritkán előforduló jelenség. A meghatározott katalitikus sebességi állandó alapján a réz(II)–tmci rendszer pH 8

körül kb. 200000-szeresére képes felgyorsítani az npp autohidrolízisét. Ez az adat jóval nagyobb a hasonló kétértékű fémionok komplexei esetén publikált értékeknél.

Eredményeink alapján az általunk vizsgált imidazolszármazékok alkalmas szerkezeti modellek, de csak közepes aktivitású funkcionális modellek. A két inozitoszármazék hidrolitikus aktivitása azonban rendkívül nagy, s talán ennél is érdekesebb és ritkán előforduló jelenség a modellkomplexek körében, hogy hatásuk szelektív a mono- illetve diészterek tekintetében.

6. Irodalomjegyzék

1. W. Kaim, B. Schwederski, *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, John Wiley and Sons, Chichester, 1994
2. J.J.R. Frausto da Silva, R.J.P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements; The Inorganic Chemistry of the Life*, Clarendon Press, Oxford, 1991
3. M. N. Hughes, *The Inorganic Chemistry of Biological Processes*, John Wiley and Sons, Chichester, 1981
4. R. H. Holm, P. Kennepohl, E. I. Solomon, Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2239
5. E. I. Solomon, K. W. Penfield, D. E. Wilcox, Active Sites in Copper Proteins. An Electronic Structure Overview, *Structure and Bonding*, Springer, Heidelberg, 1984, **53**, 1
6. W. N. Lipscomb, N. Sträter, Recent Advances in Zinc Enzymology, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 2375
7. D. E. Wilcox, Binuclear Metallohydrolases, *Chem Rev.*, 1996, **96**, 2435
8. R. G. Clewley, H. Slebocka-Tilk, R. S. Brown, *Inorg. Chim. Acta*, 1989, **157**, 233
9. E. A. Kesicki, M. A. DeRosch, L. H. Freeman, C. L. Walton, D. F. Harvey, W. C. Trogler, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 5851
10. F. Chu, J. Smith, V. M. Lynch, E. V. Anslyn, *Inorg. Chem.*, 1995, **34**, 5689
11. S. J. Lau, T. P. A. Kruck and B. Sarkar, *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, 5878
12. M. R. Malachowski, M. Adams, N. Elia, A. L. Rheingold, R. S. Kelly, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1999, 2177
13. J. Ueda, T. Ozawa, M. Miyazaki, Y. Fujiwara, *J. Inorg. Biochemistry*, 1994, **55**, 123
14. G. Tabbi, W. L. Driessen, J. Reedijk, R. P. Bonomo, N. Veldman, A. L. Spek, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 1168
15. J-L. Pierre, P. Chautemps, S. Refaif, C. Beguin, A. E. Marzouki, G. Serratrice, E. Saint-Aman, P. Rey, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 1965
16. T. N. Sorrell, *Tetrahedron*, 1989, **45**, 3
17. G. J. A. A. Koolhaas, P. M. van Berkel, S. C. van der Slot, G. Mendoza-Diaz, W. L. Driessen, J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 3525
18. G. J. A. A. Koolhaas, W. L. Driessen, J. Reedijk, H. Kooijman, A. L. Spek, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995, 517

19. G. J. A. A. Koolhaas, W. L. Driessen, J. Reedijk, J. L. van der Plas, R. A. G. de Graaff, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 1509
20. N. Wei, N. N. Murthy, Z. Tyeklár, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 1177
21. N. Kitajima, Y. Moro-oka, Copper-Dioxygen Complexes. Inorganic and Bioinorganic Perspectives, *Chem. Rev.*, 1994, **94**, 737
22. R. Than, A. A. Feldman, B. Krebs, Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphatases and catechol oxidases, *Chem. Rev.*, 1999, **182**, 211
23. H. Sigel, R. B. Martin, *Chem. Soc. Rev.*, 1994, 83
24. E. Kimura, T. Shiota, T. Koike. M. Shiro, M. Kodama, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 5805
25. R. P. Agarval, D. D. Perrin, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1975, 268
26. G. Brookes, L. D. Pettit, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1975, 2112
27. I. Sóvágó, E. Farkas, A. Gergely, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1982, 2159
28. E. Farkas, I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1984, 611
29. R. W. Hay, M. M. Hassan, C. You-Quan, *J. Inorg. Biochem.*, 1993, **52**, 17
30. T. P. Kruck, S. Lau, B. Sarkar, *Can. J. Chem.*, 1976, **54**, 1300
31. R. P. Agarval, D. D. Perrin, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1976, 89
32. C. E. Livera, L. D. Pettit, M. Bataille, B. Perly, H. Kozłowski, B. Radomska, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1987, 661
33. T. Gajda, B. Henry, J.-J. Delpuech, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1992, 2313
34. T. Gajda, B. Henry, J.-J. Delpuech, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1993, 1301
35. T. Gajda, B. Henry, J.-J. Delpuech, *Inorg. Chem.*, 1995, **34**, 2455
36. T. Gajda, B. Henry, A. Aubry, J.-J. Delpuech, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 586
37. T. Gajda, B. Henry, J.-J. Delpuech, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 1850
38. K. Burger, *Biocoordination Chemistry: Coordination Equilibria in Biologically Active Systems*, Ellis Horwood, Chichester, 1990
39. A. Yokoyama, H. Aiba, H. Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1974, **47**, 112
40. K. Várnagy, J. Szabó, I. Sóvágó, G. Malandrimos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, G. Micera, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2000, 467
41. C. C. Tang, D. Davalian, P. Huang, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 3918
42. K. Várnagy, I. Sóvágó, K. Ágoston, Zs. Likó, H. Süli-Vargha, D. Sanna, G. Micera, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1994, 2939
43. E. Mulliez, *Tetrahedron Letters*, 1989, **30**, 6169
44. A. Jancsó, T. Gajda, E. Mulliez, L. Korecz, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2000, 2679

45. D. W. Gruenwedel, *Inorg. Chem.*, 1968, **7**, 495
46. S. Chen, J. F. Richardson, R. M. Buchanan, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 2376
47. Y.-M. Frapart, A. Boussac, R. Albach, E. Anxolabéhère-Mallart, M. Delroisse, J.-B. Verlhac, G. Blondin, J.-J. Girerd, J. Guilhem, M. Cesario, A. W. Rutherford, D. Lexa, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 2669
48. K. J. Oberhausen, R. J. O'Brien, J. F. Richardson, R. M. Buchanan, *Inorg. Chim. Acta*, 1990, **173**, 145
49. K. D. Karlin, P. L. Dahlstrom, M. L. Stanford, J. Zubieta, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1979, 465
50. K. D. Karlin, P. L. Dahlstrom, J. R. Hyde, J. Zubieta, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1980, 906
51. R. W. Hay, T. Clifford, P. Lightfoot, *Polyhedron*, 1998, **17**, 4347
52. A. M. Dittler-Klingemann, C. Orvig, F. E. Hahn, F. Thaler, C. D. Hubbard, R. van Eldik, S. Schindler, I. Fábián, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 7798
53. F. Thaler, C. D. Hubbard, F. W. Heinemann, R. van Eldik, S. Schindler, I. Fábián, A. M. Dittler-Klingemann, F. E. Hahn, C. Orvig, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 4022
54. R. Krämer, T. Gajda, *Functional model complexes for dinuclear phosphoesterase enzymes, Perspectives on Bioinorganic Chemistry*, 1999, **4**, 207
55. E.E. Kim, H.W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.*, 1991, **218**, 449
56. D. L. Ollis, P. Brick, R. Hamlin, N. G. Xuong, T. A. Steitz, *Nature*, 1985, **313**, 762
57. L. Beese, T. A. Steitz, *EMBO J.*, 1991, **10**, 25
58. J. P. Guthrie, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 3991
59. J. Chin, B. Banaszczyk, V. Jubian, X. Zou, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 186
60. F. M. Menger, M. Ladika, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, **109**, 3145
61. T. Koike, M. Inoue, E. Kimura, M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 3091
62. T. Itoh, Y. Fujii, *Recent Res. Devel. in Pure and Applied Chem.*, 1998, **2**, 329
63. T. Itoh, Y. Fujii, T. Tada, Y. Yoshikawa, H. Hisada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1996, **69**, 1265
64. T. Itoh, H. Hisada, Y. Usui, Y. Fujii, *Inorg. Chim. Acta.*, 1998, **283**, 51
65. J. R. Morrow, W.C. Trogler, *Inorg. Chem.*, 1988, **27**, 3387
66. M. K. Stern, J. K. Bashkin, E. D. Sall, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 5357
67. S. Kuusela, H. Lönnberg, *J. Phys. Org. Chem.*, 1992, **5**, 803
68. E. L. Hegg, K. A. Deal, L. L. Kiessling, J. N. Burstyn, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 1715
69. M. J. Young, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 10577

70. B. Linkletter, J. Chin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, **34**, 472
71. J. A. Basile, A. L. Raphael, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, **109**, 7550
72. E. L. Hegg, J. N. Burstyn, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 7474
73. T. Itoh, H. Hisada, T. Sumiya, M. Hosono, Y. Usui, Y. Fujii, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1997, 677
74. E. E. Bernarducci, P. K. Bharadwaj, R. A. Lalancette, K. Krogh-Jespersen, J. A. Potenza, H. J. Schugar, *Inorg. Chem.*, 1983, **22**, 3911
75. K. Hegetschweiler, I. Erni, W. Schneider, H. Schmalke, *Helv. Chim. Acta*, 1990, **73**, 97
76. R. A. Moss, Y. Ihara, *J. Org. Chem.*, 1983, **48**, 588
77. F. J. C. Rosotti, H. Rossotti, *The determination of stability constants*, McGraw - Hill Book Co., 1961, 149
78. H. Irving, M. G. Miles, L. D. Pettit, *Anal. Chim. Acta*, 1967, **38**, 47
79. L. Zékány, I. Nagypál, *Computational Methods for the Determination of Stability Constants*, ed: D. Leggett, Plenum Press, New York, 1985
80. N. E. Good, G.D. Winget, W. Winter, T. N. Conolly, S. Izawa and R. M. M. Singh, *Biochemistry*, 1966, **5**, 467
81. R. E. Mesmer, C. F. Baes, F. H. Sweeton, *J. Phys. Chem.*, 1970, **74**, 1937
82. A. Rockenbauer, L. Korecz, *Appl. Magn. Reson.*, 1996, **10**, 29
83. F. Huber, R. Griesser, H. Sigel, *Inorg. Chem.*, 1971, **10**, 945
84. S. C. Zimmermann, J. S. Korthals, K. D. Cramer, *Tetrahedron*, 1991, **47**, 2649
85. A. Odani, H. Masuda, K. Inukai, O. Yamauchi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 6294
86. F. Holmes, D. R. Williams, *J. Chem. Soc.*, 1967, 1256
87. H. Sigel, P. Huber, R. Pasternak, *Inorg. Chem.*, 1971, **10**, 2226
88. P. Daniele, G. Ostacoli, P. Caldaro, *Ann. Chim.(Rome)*, 1976, **66**, 127
89. B. Gyurcsik, T. Gajda, A. Jancsó, R. Lammers, L. Nagy, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1997, 2125
90. K. D. Karlin, J. C. Hayes, S. Juen, J. P. Hutchinson, J. Zubieta, *Inorg. Chem.*, 1982, **21**, 4106
91. M. Duggan, N. Ray, B. Hathaway, G. Tomlinson, P. Brint, K. Pelin, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1980, 1342
92. D.-H. Lee, N. N. Murthy, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 5785
93. N. Wei, N. N. Murthy, Z. Tyeklár, K. D. Karlin, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 6093
94. P. G. Daniele, O. Zerbinati, R. Aruga, G. Ostacoli, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1988, 1115
95. R. Pogni, G. D. Lunga, R. Basosi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 1546

96. T. Kiss, A. Gergely, *Inorg. Chim. Acta*, 1979, **36**, 31
97. A. Gergely, T. Kiss, *Inorg. Chim. Acta*, 1976, **16**, 51
98. A. Gergely, T. Kiss, Gy. Deák, *Inorg. Chim. Acta*, 1979, **36**, 113
99. T. Kiss, Gy. Deák, A. Gergely, *Inorg. Chim. Acta*, 1984, **91**, 269
100. P. R. Huber, R. Griesser, B. Prijs, H. Sigel, *European J. Biochem.*, 1969, **10**, 238
101. R. K. Boggess, R. B. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 3076
102. P. Daniele, O. Zerbinati, G. Negro, *Ann. Chim.(Rome)*, 1987, **77**, 879
103. S. Sjöberg, *Pure and Appl. Chem.*, 1997, **69**, 1549
104. Várnagy K., Sóvágó I. és Ágoston K., *Magyar Kémiai Folyóirat*, 1994, 3.sz., 127
105. K. Sun Bai and A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, 1969, **91**, 4412
106. B. Noszál, *J. Phys. Chem.*, 1986, **90**, 4104
107. D. L. Rabenstein, S. A. Daignault, A. A. Isab, A. P. Arnold and M. M. Shoukry, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 6435
108. M. Wienken, B. Lippert, E. Zangrando and L. Randaccio, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 1985
109. P. Chaudhuri, I. Karpenstein, M. Winter, M. Lengen, C. Butzlaff, E. Bill, A. X. Trautwein, U. Flörke and H.-J. Haupt, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 888
110. G. Peintler, I. Nagypál, A. Jancsó, I. R. Epstein and K. Kustin, *J. Phys. Chem.*, 1997, **101**, 8013
111. R. Hay and P. Morris, *J. Chem. Soc. A*, 1971, 1518
112. S. Kuusela and H. Lönnberg, *J. Phys. Org. Chem.*, 1993, **6**, 347
113. T. Gajda, R. Krämer and A. Jancsó, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2000, 1635
114. K. Hegetschweiler, V. Gramlich, M. Ghisletta and H. Samaras, *Inorg. Chem.*, 1998, **31**, 2341
115. J. N. Morrow, K. Aures, D. Epstein, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1995, 2431
116. M. J. Young, D. Wahnnon, R. C. Hynes, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 9441
117. T. Kradolfer, K. Hegetschweiler, *Helv. Chim. Acta*, 1992, **75**, 2243
118. F. M. Menger, L. H. Gan, E. Johnson and D. H. Durst, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, **109**, 2800
119. M. Wall, R. C. Hynes and J. Chin, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1993, **32**, 1633
120. E. Kövári and R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 12704
121. S. J. Oh, K. H. Song, D. Whang, K. Kim, T. H. Yoon, H. Moon and J. W. Park, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 3780.
122. R. Hettich and H.-J. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 5638
123. B. T. Takasi and J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 8582

- 124. R. Ott and R. Krämer, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 1998, **37**, 1957
- 125. K. Bracken, R. A. Moss and K. G. Ragunathan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 9323
- 126. D. H. Vance, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 12165

7. Summary

Small molecular model compounds are extensively applied to imitate the active sites of biomolecules. Coordination chemical and kinetic studies of low molecular weight metal complexes contribute to understand better the structural and functional properties of metalloproteins and metalloenzymes. These investigations are not only simpler and cheaper than those of the native macromolecules but provide also an opportunity for developing so called artificial enzymes by means of highly active model systems. Molecular structure of the active centres of metalloproteins are fundamentally determined by coordination of side-chain donor groups. In this respect the imidazole ring is one of the most important residues because of its versatility offering an extremely stable metal-binding site in physiological pH range. Imidazole moiety can be found in almost all copper(II)- and zinc(II)enzymes, its presence is often related to hydrolytic reactions even in absence of metal ions. One of the most abundant classes of hydrolytic enzymes are phosphatases, which hydrolyse phosphate ester bonds and are involved in a number of biological processes. Besides crystallographic and kinetic studies of these native enzymes, low molecular weight functional models have attracted great interest due to their applications in biotechnology and chemotherapy.

In the present Ph.D. work copper(II)-, zinc(II)- and nickel(II)-complexes of several imidazole containing ligands and some methylated derivatives of 1,3,5-trideoxy-1,3,5-triamino-*cis*-inositol ensuring rather rigid, preorganised structures have been studied. Imidazole-based ligands having very different basicity and metal binding ability are good models for studying the coordination behaviour of the imidazole ring in the presence of varied donor groups and substituents. Most of the systems have been investigated by solution equilibrium and structural methods. In case of some imidazole derivatives ternary complex formation was studied with catecholamines which play an essential role in various neurological and biochemical processes. Kinetic measurements have been performed at different pH, concentrations and metal-to-ligand ratios in those systems which proved to be highly active on the cleavage of phosphate esters. Kinetic data combined with the equilibrium and structural results allowed to identify the active species and to draw mechanistic conclusions. The aim of the present work were the followings:

- detailed description of the solution equilibrium speciation of metal complexes
- structure determination of species formed by means of several solution structural methods
- kinetic analysis of model systems towards hydrolysis of phosphate esters

Experimental methods

Solution equilibria, speciation and composition of species formed have been studied by pH-metric and combined pH-metric/spectrophotometric methods. Experimental data have been evaluated by a computer program PSEQUAD.

Several solution structural methods (UV/VIS-, EPR-, CD-, NMR-spectroscopy) have been applied to characterise the solution structure of metal complexes. EPR-spectroscopy have been used to get information on copper(II)-complexes (e.g. number of nitrogen atoms, structure distortion etc.) and to identify dinuclear species. ^1H NMR measurements have been performed to characterise the zinc(II)-complexes. This method proved to be very useful in case of slow ligand exchange (as compared to the NMR time-scale).

The hydrolysis of activated and nonactivated phosphate esters have been followed by spectrophotometry and HPLC techniques respectively. Spectrophotometric experiments were based on the appearance of p-nitrophenolate ion at 400 nm which is the hydrolytic product of the activated esters. In case of the nonactivated esters reversed phased HPLC have been applied to separate the original substrate and the products and their quantity was monitored at 260 nm.

Results

All of the three bidentate imidazole-containing ligands (aic, iaa, biim) form ML and ML_2 parent complexes with copper(II)-, zinc(II)- and nickel(II)ions. In spite of the low basicity of the imidazole donor groups, the ligands are able to form particularly stable complexes due to the formation of five- or six-membered chelate ring and the strong π -acceptor property of the imidazole ring. In the copper(II)–iaa system further deprotonations were observed at higher pH, which resulted in a formation of oligomer complexes.

The biib ligand, which contains bis-imidazolyl unit, offers extremely stable bi-, tri- and tetradentate coordination to copper(II) in its mono- and dinuclear complexes. In equimolar solution two major species (CuLH és Cu_2L_2) are formed and in case of metal excess a dinuclear $\text{Cu}_2\text{LH}_{-1}$ complex is dominant. The low temperature EPR spectrum of the CuLH complex were assigned to the two coexisting binding isomers having identical composition but different structures. The two dinuclear complexes show magnetic interaction between metal centres. The EPR spectra of the Cu_2L_2 is a characteristic triplet with high zero-field splitting, which indicates symmetric structure with indirectly coupled metal centres. The biib is a tripodal ligand and according to the results the coordination of the four donor groups to one metal ion can be excluded because of steric hindrance. However the structure of the ligand is favourable to the formation of dinuclear species.

The tripodal, tetradentate bimha containing also three imidazole rings forms mono- and bis-complexes with different protonation states, but in the zinc(II)–bimha system only mono-complexes have been detected. Most of these species possess (distorted) octahedral geometry, but pentacoordinated structure is preferred in the ML complexes. The CuL presumably has square pyramidal geometry, while trigonal bipyramidal structure is proposed for ZnL. The geometrical difference between the ML complexes can help to explain the diverse behaviour in terms of bis-complex formation. The square pyramidal CuL complex, with the bridgehead nitrogen in one of the basal positions, seems to transform easily into an octahedral species through the substitution of an equatorial imidazole nitrogen by the second ligand. The trigonal bipyramidal ZnL species, with the bridgehead nitrogen in the apical position, is less susceptible to the coordination of a second ligand.

The two studied structurally similar tripodal ligands (biib and bimha) have basically different coordination chemical behaviour. The bimha has longer arms than the biib and thus the four donor groups are able to coordinate to one metal ion, too.

The linear tetradentate bimdm and mbimdm form extremely stable ML complexes with copper(II)- and zinc(II)ions in wide pH range having $\{2N_{im}, 2N_{am}\}$ coordination. In the presence of both metal ions further deprotonation can be observed above pH 9, which results water soluble MLH_1 species only in case of mbimdm. The $ZnL(OH)$ complex of mbimdm proved to be active towards the hydrolysis of activated bis(4-nitrophenyl)phosphate. The metal complexes of the bimdm and mbimdm form $MLAH_2$, $MLAH$ and MLA mixed complexes with catecholamines. In these mixed complexes catecholamines are coordinated in a catechol like bonding mode with the exception of the $MLAH_2$ complex of L-dopa, where the aminoacid type coordination is dominant. In the copper(II)-containing mixed complexes at least three nitrogens of tetradentate ligands bound to metal ion, while in case of zinc(II) presumably all of the four nitrogens are coordinated.

The hexadentate dhen containing histamine like donor sets form considerably stable dinuclear M_2L_2 complexes with copper(II)- and zinc(II)ions having bis(histamine-like) coordination in the physiological pH. The MLH_2 complex, also formed in both systems above pH 10, has different structures with the two metal ions. A presumably hydroxo mixed-ligand complex is formed in case of zinc(II), while the base-consuming processes are assigned to metal-promoted deprotonation of amide nitrogens in the copper(II) containing system. Between these two dominant species tetranuclear, cyclic oligomer complexes are formed in both case, as suggested by the EPR, CD and NMR results, in which the four metal ions are bounded by bidentate imidazolate anions. The hydrolytic activity of the zinc(II)–dhen system

towards the hydrolysis of 2',3'-cUMP is constant in wide pH range and increases only at higher pH.

The zinc(II)–histamine complexes efficiently hydrolyse the non-activated 2',3'-cUMP as opposed to our expectations. Kinetic data, obtained at different pH, concentrations and metal-to-ligand ratios combined with the concentration distribution of five species provided by equilibrium data have been used to determine the individual contributions of all species to the hydrolysis rate. Not only the ZnL(OH) complex, but also the Zn(OH) formed in small amount is highly active towards the hydrolysis of the 2',3'-cUMP.

The copper(II)–tdci system was proved to be extremely active towards the hydrolysis of the examined two activated DNA model substrate – 2,4-dinitrophenyl-ethyl-phosphate and bis(4-nitrophenyl)phosphate (bnpp). The second-order rate constant is ($0.95 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) is ca. 47600-fold higher than that of the hydroxide ion catalysed hydrolysis and the rate acceleration is 3.5×10^7 -fold compared to the autohydrolysis in the presence of 4 mM dinuclear complex at pH 8.6. On the basis of equilibrium and kinetic data the dinuclear Cu_2LH_3 complex is responsible for the hydrolytic activity. The hydrolysis was proved to be catalytic and selective for the phosphodiester bnpp. The proposed bifunctional mechanism of the hydrolysis includes double Lewis acid activation and intramolecular nucleophilic catalysis. The Cu_2LH_3 species is more active for bnpp hydrolysis than any other divalent metal complex as well as most of the lanthanide(III)-complexes.

The copper(II)–tmci system is extremely active for the hydrolysis of 4-nitrophenyl-phosphate (npp) and selective for the phosphomonoester because it was proved to be inactive towards the hydrolysis of the diester bnpp. Only few metal containing systems are able to accelerate the hydrolysis of npp having two negative charges in the physiological pH range owing to the significant electrostatic repulsion hindering the nucleophilic hydroxide. Similarly to the copper(II)–tdci system the hydrolytic activity is also assigned to a dinuclear complex. The initial rate – substrate concentration profile refers to inhibition, which is well-known in case of enzymes, but remarkably rare in terms of model complexes. The catalytic rate constant is about 200000-fold higher than the autohydrolysis of npp at pH 8 and this data is much more higher than those of the metal complexes of similar bivalent metal ions.

According to the results imidazole derivatives are good structural models, but only moderately active functional models. The hydrolytic activity of the two inositol compounds is extremely high and they are selective for the hydrolysis of phosphate mono- or diesters.

8. A disszertáció anyagához kapcsolódó és egyéb közlemények

A disszertáció anyagához kapcsolódó közlemények

1. I. Török, P. Surdy, A. Rockenbauer, L. Korecz Jr., G. J. A. A. Koolhaas, T. Gajda, "Nickel(II)-, copper(II)- and zinc(II)-complexes of some substituted imidazole ligands", *J. Inorg. Biochem.*, 1998, **71**, 7
2. I. Török, T. Gajda, B. Gyurcsik, G. K. Tóth, A. Péter, "Metal complexes of imidazole-ligands containing histamine-like donor sets: equilibrium, solution structure and hydrolytic activity", *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1998, 1205
3. T. Gajda, Y. Düpre, I. Török, J. Harmer, A. Schweiger, J. Sander, D. Kuppert, K. Hegetschweiler, "Highly efficient phosphodiester hydrolysis promoted by a dinuclear copper(II) complex", *Inorg. Chem.*, 2001, **40**, 4918
4. A. Jancsó, I. Török, L. Korecz, A. Rockenbauer, T. Gajda, "Metal ion coordination of a tripodal imidazole-derivative and its tridentate constituent: equilibrium and structural studies", *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2002, 2601
5. I. Török, T. Gajda, B. Gyurcsik, T. Kiss, A. Rockenbauer, L. Korecz Jr, J.-B. Verlac, "Copper(II) and zinc(II)-complexes of imidazole containing polidentate ligands in binary and ternary systems with catecholamines", *J. Inorg. Biochem.*, közlésre előkészítve

Egyéb közlemények

1. J. C. Pessoa, T. Gajda, R. D. Gillard, T. Kiss, S. M. Luz, J. J. G. Moura, I. Tomaz, J. P. Telo, I. Török, "Oxovanadium(IV) complexes of the dipeptides glycyl-L-aspartic acid, L-aspartylglycine and related ligands; a spectroscopic and potentiometric study", *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1998, 3587

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Kiss Tamás tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette számomra a doktori munka elvégzését a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Gajda Tamás egyetemi docensnek, témavezetőmnek, aki a kémiatudomány rendkívül érdekes területével, a bioszervetlen kémiai modellezéssel ismertetett meg. Segítségével számos koordinációs kémiai vizsgálati módszerben szerezhettem jártasságot, munkámat mindvégig hasznos szakmai tanácsokkal támogatta.

Szeretném megköszönni Gyurcsik Bélának a CD-spektroszkópiás mérések kiértékelésekor, Korecz Lászlónak és Rockenbauer Antalnak az ESR-spektrumok felvételekor nyújtott segítségét.

Köszönöm Nagy Ferencné és Szűcsné Tóth Katalin technikusoknak a laboratóriumi munkában nyújtott segítségüket.